



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia  
2009

**Patrícia Isabel  
Ferreira Marques**

***Imprinting* genómico na espermatogénese anormal  
devido a paragem meiótica**



**Patrícia Isabel  
Ferreira Marques**

***Imprinting* genómico na espermatogénese anormal  
devido a paragem meiótica**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Doutor Mário de Sousa, Professor Catedrático do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar e da Doutora Maria de Lourdes Pereira, Professora Associada com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho a todos que adoram “fazer ciência”, principalmente aos que a fazem recebendo somente o prazer de a fazer.

## **o júri**

presidente

**Prof<sup>a</sup>. Doutora Maria Helena Silva**

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor Mário Manuel da Silva Leite de Sousa**

Professor Catedrático do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

**Porf<sup>a</sup> Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira**

Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Doutora Ana Isabel Fernandes Grangeia**

Investigadora Doutorada do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

## **agradecimentos**

A realização deste trabalho foi muito gratificante, não só pela aprendizagem mas também pela experiência pessoal e quero agradecer a todos que fizeram parte dela.

Aos meus orientadores, Professor Mário Sousa pelo apoio, pela oportunidade que me deu em poder realizar o mestrado numa área que me fascina e por poder fazer parte duma óptima equipa; à Professora Maria de Lourdes pelo apoio e disponibilidade demonstrada.

À Cristina Joana, por tudo o que me ensinou, pela amizade, pelo apoio incondicional e que mesmo estando longe esteve sempre “cá” para mim.

Ao Professor Alberto Barros, pela oportunidade de realizar o trabalho no Serviço de Genética da Faculdade de Medicina do Porto.

A todos do Serviço de Genética da FMUP pela boa disposição e carinho com que me acolheram.

À Filipa e à Susana Fernandes, pelo apoio e ensinamentos transmitidos.

À Berta, Susana Ferreira e Ana Grangeia pela amizade, simpatia e apoio nos meus momentos de frustração.

À Inês, Mónica, Ana Paula, Cristina, Luís e Liliana pela amizade e momentos de convívio e diversão.

Às meninas da citogenética, em especial à Lina, à Maria João e a Ana Joana pela amizade, apoio e boa disposição.

À D. Ana Maria que tantos faxes enviou...pela simpatia.

Ao Serviço de Microbiologia da FMUP, nomeadamente ao Sr. João por toda a ajuda e colaboração

Ao Fred, pelo carinho, apoio, compreensão e por me ter ajudado a embelezar esta tese, o meu muito obrigado!

## palavras-chave

*Imprinting* genómico, infertilidade masculina, paragem de maturação meiótica, metilação do DNA.

## resumo

O *imprinting* genómico é um mecanismo epigenético, no qual os alelos parentais são expressos diferencialmente, resultando em expressão monoalélica dos genes *imprinted*. Uma das marcas de *imprinting* é a metilação do DNA em dinucleótidos CpG, que permite a transcrição ou repressão dos genes. Na linha germinal masculina, as marcas de *imprinting* herdadas são apagadas e são restabelecidas as marcas paternas.

A infertilidade masculina é um problema que afecta muitos casais, podendo ter várias causas. A azoospermia secretora devido a paragem de maturação meiótica é caracterizada pela presença de células germinativas que não completam o desenvolvimento espermatogénico, parando no estadio de espermatócito primário. A paragem de maturação (PM) pode ser completa, sem produção de espermatozóides (PM pura), ou incompleta, com focos de espermatozóides visíveis em biópsias testiculares (PM não pura).

Com este trabalho pretendeu-se estudar, por tratamento com bissulfito de sódio, clonagem molecular e sequenciação de DNA, os perfis de metilação dos genes *imprinted H19* e *MEST*, em pacientes com azoospermia secretora devido a PM meiótica, e comparar estes perfis em espermatócitos primários de PMs puras e não puras.

Os resultados obtidos para os espermatócitos primários de PMs puras e PMs não puras sugerem que não existem diferenças entre os dois grupos em termos de metilação dos genes *imprinted*. No entanto, estes resultados revelam que as células espermatogénicas dos pacientes de ambos os grupos apresentam erros de *imprinting* tais como alguma desmetilação no gene *H19*, incluindo o local de ligação-6 da proteína CTCF, e alguma metilação do gene *MEST*, suportando uma associação entre espermatogénese anormal e ocorrência de erros de *imprinting*.

**keywords**

Genomic *imprinting*, male infertility, meiotic maturation arrest, DNA methylation.

**abstract**

Genomic *imprinting* is an epigenetic mechanism that leads to the differential expression of parental alleles, resulting in mono-allelic expression of imprinted genes. DNA methylation at CpG dinucleotides is an *imprinting* mark that allows the transcription or repression of the genes. In the male germ line the heritable *imprinting* marks are erased and re-established the paternal marks.

Male infertility is a problem affecting many couples and may have different causes. Non obstructive azoospermia with meiotic maturation arrest is characterized by the presence of germ cells that do not complete the spermatogenic development, stopping at primary spermatocyte stage. The maturation arrest (MA) may be complete, with no spermatozoa produced (pure MA), or incomplete, with rare spermatozoa in the testis (non pure MA).

We studied the methylation status of the imprinted genes *H19* and *MEST*, by sodium bisulphite treatment, molecular cloning and DNA sequencing, in patients with meiotic MA. We also compared the methylation profiles obtained for primary spermatocytes of pure MA with those obtained for non pure MA.

The results obtained for primary spermatocytes of pure MA and non pure MA suggests that these groups are not different in terms of methylation of the imprinted genes. However, these results reveal that the spermatogenic cells of the patients of both groups presents *imprinting* errors such as some demethylation for *H19*, including the CTCF-binding site 6, and some methylation for *MEST*, supporting the association between abnormal spermatogenesis and the occurrence of *imprinting* errors.

---

## Índice

Abreviaturas.....	4
1. INTRODUÇÃO.....	5
1.1    Espermatogénese Humana.....	6
1.1.1    Espermatogoniogénese.....	7
1.1.2    Maturação dos Espermatócitos .....	8
1.1.3    Espermiogénese .....	8
1.1.4    Infertilidade Masculina .....	9
1.2 <i>Imprinting</i> Genómico.....	12
1.2.1    Ciclo de Vida das Marcas de <i>Imprinting</i> .....	13
1.2.2    Metiltransferases do DNA.....	14
1.2.3    Genes <i>Imprinted</i> .....	15
1.2.3.1    Genes <i>H19</i> e <i>IGF2</i> .....	15
1.2.3.2    Genes <i>MEST/PEG1</i> .....	17
1.3 <i>Imprinting</i> Genómico na Espermatogénese.....	19
Objectivos .....	20
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
2.1    Seleccção de Pacientes.....	23
2.2    Extracção de DNA.....	23
2.3    Tratamento com Bissulfito de Sódio .....	24
2.4    Amplificação dos genes <i>H19</i> e <i>MEST</i> .....	24
2.5    Electroforese Capilar .....	26
2.6    Purificação dos produtos de PCR .....	28
2.7    Clonagem Molecular .....	28
2.8    Amplificação do plasmídeo .....	30
2.9    Sequenciação.....	31
2.10    Análise estatística .....	32
3. RESULTADOS .....	33
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO .....	46
5. BIBLIOGRAFIA .....	53
6. ANEXOS .....	64



---

## Lista de Figuras

Figura 1 – Espermatogénese humana.....	7
Figura 2 – Esquema de um espermatozóide .....	9
Figura 3 – Ciclo de vida das marcas de <i>imprinting</i> .. .....	14
Figura 4 – Regulação da expressão dos genes <i>H19</i> e <i>Igf2</i> . ....	16
Figura 5 – Conversão de citosinas pelo tratamento com Bissulfito de Sódio. ....	24
Figura 6 – Programa da 1ª reacção de PCR. ....	25
Figura 7 – Programa da 2ª reacção de PCR. ....	26
Figura 8 – Esquema do funcionamento do sistema QIAxcel .....	27
Figura 9 – Mapa do vector pCRII-TOPO. ....	29
Figura 10 – Programa da reacção de PCR M13. ....	30
Figura 11 – Electroforograma de produtos resultante da amplificação do plasmídeo após clonagem. ....	31
Figura 12 – Perfis de metilação do gene <i>H19</i> de pacientes com paragem de maturação meiótica pura.....	34
Figura 13 – Perfis de metilação do gene <i>H19</i> de pacientes com paragem de maturação meiótica não pura. ....	35
Figura 14 – Perfis de metilação do gene <i>MEST</i> de pacientes com paragem de maturação meiótica pura.....	39
Figura 15 – Perfis de metilação do gene <i>MEST</i> de pacientes com paragem de maturação meiótica não pura. ....	40
Figura 16 – Perfis globais de metilação do gene <i>H19</i> de pacientes com paragem de maturação.....	42
Figura 17 – Perfis globais de metilação do gene <i>MEST</i> de pacientes com paragem de maturação. ....	43
Figura 18 – Perfis de metilação dos genes <i>H19</i> e <i>MEST</i> de estadios adicionais de pacientes com paragem de maturação não pura. ....	44
Figura 19 – Condições para a reacção de conversão. ....	65

---

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Nomenclatura para análise de sêmen. ....	10
Tabela 2 – Reagentes utilizados na realização deste trabalho. ....	22
Tabela 3 – <i>Primers</i> utilizados na 1ª reacção de PCR. ....	25
Tabela 4 – <i>Primers</i> utilizados na 2ª reacção de PCR . ....	26
Tabela 5 – Resultados da metilação do gene <i>H19</i> e da desmetilação do gene <i>MEST</i> , por paciente. ....	38
Tabela 6 – Resultados globais da metilação do gene <i>H19</i> e da desmetilação do gene <i>MEST</i> . ....	45
Tabela 7 – Componentes da Reacção de Bissulfito de Sódio. ....	65
Tabela 8 – Componentes da reacção de clonagem. ....	68

**Abreviaturas**

BORIS	<i>Brother Of the Regulator of Imprinting Sites</i>
CpG	Citosina-fosfato-guanina
CTCF	<i>CCCTC-binding factor</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DNMT	Metiltransferases do DNA
DTT	<i>Dithio-threitol</i>
HCl	Ácido Clorídrico
ICSI	<i>Intracytoplasmatic sperm injection</i> (Injecção intracitoplasmática de espermatozóides)
IGF2	<i>Insulin-like Growth Factor 2</i>
IVF	<i>In vitro fertilization</i>
KOH	Hidróxido de potássio
MEST/PEG1	<i>Mesodermal Specific Transcript/ Paternally Expressed Gene 1</i>
MESTIT1	MEST Intronic Transcript 1
ORF	<i>Open reading frame</i>
PM	Paragem de Maturação
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacção em Cadeia da Polimerase)
RDM	Região Diferencialmente Metilada
Sa	Espermatídeos redondos
Sc	Células de Sertoli
Sd	Espermatídeos alongados
SPM	<i>Sperm preparation medium</i>
SSCP	<i>Single strand conformation polymorphism</i>
ST1	Espermatócitos primários
ST2	Espermatócitos secundários
Sz	Espermatozóides

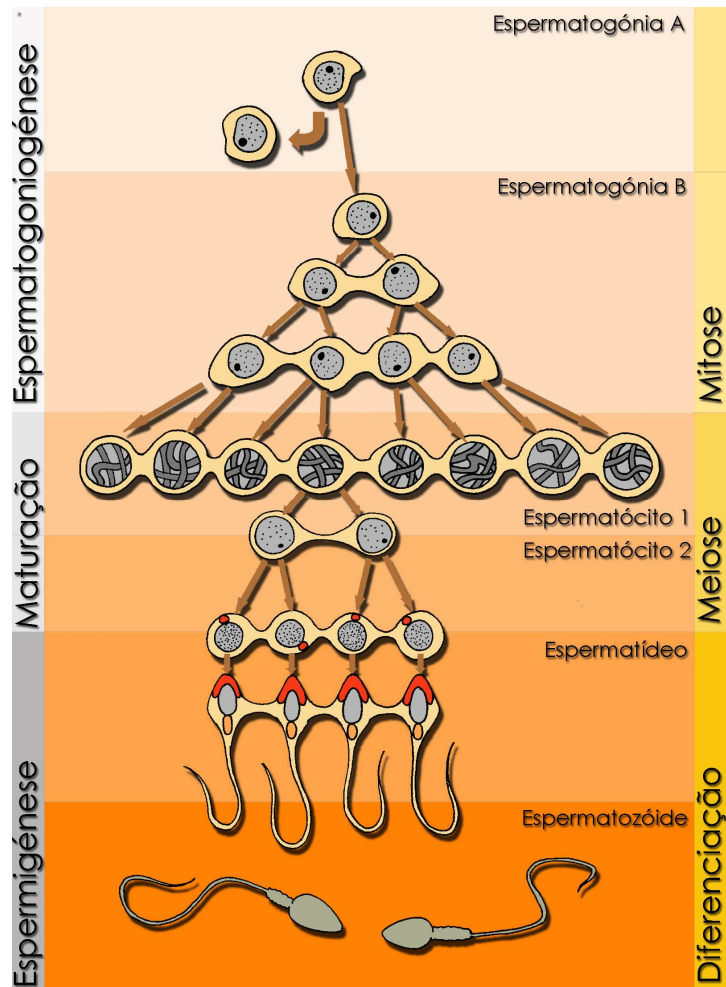
## 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1 Espermatogénese Humana

A espermatogénese é o processo biológico através do qual as células germinativas indiferenciadas produzem os espermatozóides (Figura 1) e ocorre nos túbulos seminíferos presentes no testículo. Cada um destes túbulos é limitado por uma lâmina basal e uma camada de células de músculo liso, responsáveis pelos movimentos peristálticos dos túbulos. No centro de cada túbulo está o lúmen, preenchido por fluído que contém espermatozóides. O epitélio do túbulo é constituído por células germinativas em desenvolvimento e por células de Sertoli, as quais formam a barreira hemato-testicular. Esta impede a entrada de muitas substâncias químicas do sangue para o lúmen, assegurando as condições próprias para o desenvolvimento e diferenciação das células germinativas. As células de Sertoli têm também a função de fornecer suporte, nutrientes e factores de maturação às células germinativas (Sousa & Barros, 2000). Recentemente, foi revista a organização do epitélio seminífero, no qual foi observado um compartimento basal atípico, sugerindo que o epitélio se encontra organizado em três compartimentos: basal, intermédio e adluminal (Futoshi, 2008).

A espermatogénese encontra-se dividida em três fases: espermatogoniogénese, maturação dos espermatócitos e finalmente a espermiogénese (Holstein *et al.*, 2003) (Figura 1).



**Figura 1 – Esquema representativo da espermatogénese humana, ilustrando as três fases que a constituem: espermatogoniogénese, maturação dos espermatócitos e espermiogénese (adaptado de [www.embryology.ch/](http://www.embryology.ch/)).**

### 1.1.1 Espermatogoniogénese

Na base do epitélio existem células indiferenciadas e pluripotentes denominadas espermatogónias (Sousa & Barros, 2000). Nos humanos encontram-se descritos dois tipos de espermatogónias: espermatogónias A, que pertencem ao *pool* de células estaminais, e as espermatogónias B que representam o início da espermatogénese em si (Holstein *et al.*, 2003). As espermatogónias B (diplóides) sofrem mitoses sucessivas e originam os espermatócitos. Contudo, estas divisões são incompletas porque as células filhas permanecem ligadas por

pontes citoplasmáticas que são dissolvidas apenas em estádios avançados da espermatogénese (Holstein *et al.*, 2003).

### **1.1.2 Maturação dos Espermatócitos**

A maturação dos espermatócitos consiste na divisão meiótica dos mesmos. Uma vez que o processo de meiose envolve duas divisões, as células anteriores à primeira divisão são designadas por espermatócitos primários. Cada espermatócito primário sofre a primeira divisão meiótica formando dois espermatócitos secundários. Estas células contêm metade do número de cromossomas mas o conteúdo total de DNA é equivalente às células diplóides ( $2N$ ), dado que os cromossomas são compostos por um par de cromátides. Cada espermatócito secundário sofre a segunda divisão meiótica, na qual as cromátides de cada cromossoma se separam e migram para as células filhas, denominadas espermatídeos redondos. Estas são as primeiras células totalmente haplóides (Sousa & Barros., 2000).

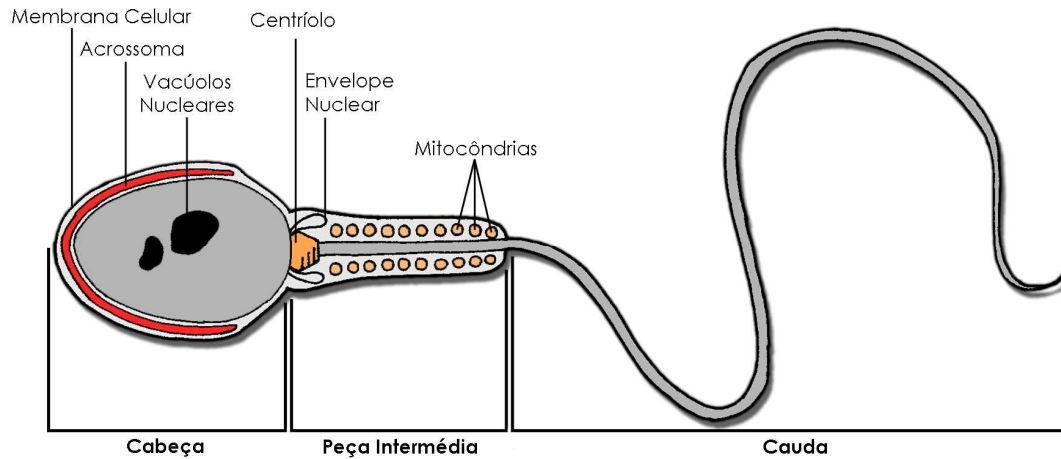
### **1.1.3 Espermiação**

Após a formação dos espermatídeos redondos ocorre a espermiação, na qual cada espermatídeo se diferencia num espermatozóide. Este processo é simplesmente uma diferenciação celular sem ocorrência de divisões (Sousa & Barros, 2000).

Durante a espermiação ocorre a condensação da cromatina nuclear, formação da enzima acrosina, presente na vesícula acrosómica (Mack *et al.*, 1983), e desenvolvimento do flagelo. Esta fase da espermatogénese termina quando os gametas masculinos são libertados das células de Sertoli para o lúmen dos túbulos seminíferos (espermiação) e se tornam células livres, denominadas espermatozoides (Holstein *et al.*, 2003).

O espermatozóide apresenta aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  de comprimento e consiste em três regiões morfológica e funcionalmente distintas: a cabeça, a peça intermédia e a cauda, envoltos por uma única membrana plasmática (Figura 2). Os espermatozoides são desprovidos de todo o material celular

desnecessário para a fecundação do ovócito tal como ribossomas, retículo endoplasmático e aparelho de Golgi.



**Figura 2 – Esquema representativo de um espermatozóide, com as três regiões principais: cabeça, peça intermédia e cauda (adaptado de [www.medical-look.com](http://www.medical-look.com)).**

A cabeça é constituída maioritariamente pelo núcleo, que contém a informação genética. O DNA no núcleo encontra-se extremamente condensado, de modo a manter o volume o mais pequeno possível e a proteger o DNA contra qualquer lesão durante o transporte. A zona anterior do núcleo encontra-se revestida pela vesícula acrossómica que possui as enzimas hidrolíticas essenciais para a penetração na zona pelúcida do ovócito.

A cauda é um longo flagelo composto por estruturas que permitem o seu movimento, os microtúbulos. Na zona anterior da cauda do espermatozóide localiza-se a peça intermédia, na qual os microtúbulos estão rodeados por mitocôndrias altamente especializadas, que fornecem a energia para o movimento da cauda (Sousa & Barros, 2000).

#### **1.1.4 Infertilidade Masculina**

A proliferação e a diferenciação das células germinativas masculinas são fenómenos sensíveis que poderão ser alterados por vários factores. Estes podem ser factores ambientais tais como álcool, tabaco, radiações e outros agentes



tóxicos, ou podem estar associadas a doenças que afectam directa ou indirectamente a espermatogénese.

A análise do ejaculado ao microscópio óptico permite avaliar o número de espermatozóides, os padrões de mobilidade e morfologia dos mesmos. Estes parâmetros fornecem a primeira informação sobre a qualidade do sémen do paciente, uma vez que um número reduzido de espermatozóides, predominância de espermatozóides com morfologia anormal ou com mobilidade reduzida, ou inexistente, podem causar fertilidade reduzida ou infertilidade no paciente (Tabela 1).

**Tabela 1 – Nomenclatura para análise de sémen (WHO 1999).**

<b>Normozoospermia</b>	Número de espermatozóides: $\geq 20$ milhões/mL; Motilidade: $\geq 50\%$ dos espermatozóides com motilidade progressiva rápida ou lenta ou $\geq 25\%$ com motilidade progressiva rápida. Morfologia: $\geq 14\%$ dos espermatozóides com morfologia normal.
<b>Oligozoospermia</b>	Número de espermatozóides: $< 20$ milhões/mL.
<b>Astenozoospermia</b>	Motilidade: $< 50\%$ dos espermatozóides com motilidade progressiva rápida ou lenta ou $< 25\%$ com motilidade progressiva rápida.
<b>Teratozoospermia</b>	Morfologia: $< 14\%$ dos espermatozóides com morfologia normal.
<b>Azoospermia</b>	Sem espermatozóides no ejaculado.
<b>Aspermia</b>	Sem ejaculado.

Contudo, este tipo de avaliação do ejaculado não fornece informação sobre as possíveis causas dos defeitos na espermatogénese. Uma avaliação por biópsia testicular pode revelar uma variedade de perturbações com origem nos diferentes passos da espermatogénese, que podem conduzir a vários síndromes testiculares tais como hipoplasia germinativa (ou hipoespermatogénese),

paragem de maturação (PM) ou presença de apenas células de Sertoli (Síndrome de só células de Sertoli).

A paragem de maturação é caracterizada pela presença de células germinativas que não completam o desenvolvimento espermatogénico, parando no estadio de espermatócito primário. A paragem de maturação pode ser completa, sem produção de espermatozóides (PM pura), ou incompleta, com focos de espermatozóides visíveis em biópsias testiculares (PM não pura) (Hung *et al.*, 2007).

Clinicamente, pacientes com PM podem apresentar azoospermia não obstrutiva ou oligozoospermia muito grave (Hung *et al.*, 2007). Estas patologias foram descritas como estando associadas a anomalias genéticas tais como microdelecções do cromossoma Y (Fernandes *et al.*, 2002; Ferrás *et al.*, 2004). Embora a delecção da AZFb seja a mais comum em pacientes com paragem de maturação (Hung *et al.*, 2007), as delecções de AZFa e AZFb+c também foram descritas (Yang *et al.*, 2007). Em pacientes com PM não pura, foi verificada uma elevada incidência das delecções em AZFc e DAZ1/DAZ2, tendo sido esta última associada a um fenótipo testicular de espermiogénese residual (Ferrás *et al.*, 2004).

## 1.2 *Imprinting* Genómico

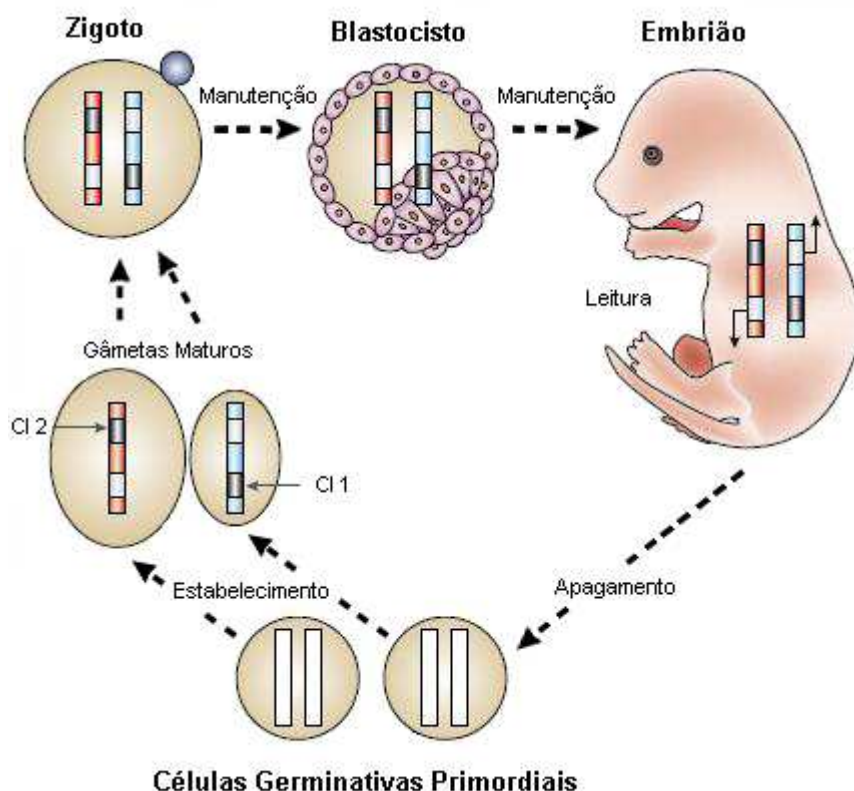
O *imprinting* genómico regula a expressão dos genomas materno e paterno nos mamíferos, resultando na expressão monoalélica dos genes *imprinted*. Este processo é vital para uma expressão génica correcta num indivíduo, uma vez que erros de *imprinting* podem resultar numa transcrição génica ou silenciamento génico inapropriados, causando por vezes os chamados síndromes de *imprinting*, tais como o síndrome de Beckwith-Wiedemann e os síndromes de Prader-Willi e Angelman, entre outros (Reik & Walter, 2001).

O *imprinting* genómico foi descoberto no início da década de 80, como resultado de estudos em ratinhos. Foram realizadas experiências de transplantação nuclear de modo a obter embriões que possuísem dois conjuntos de cromossomas do mesmo sexo parental (embriões uniparentais) (Reik & Walter, 2001). Nestes estudos, observou-se que, quer os androgenotos (zigotos com dois pró-núcleos masculinos) quer os ginogenotos (zigotos com dois pró-núcleos femininos) não se desenvolviam até ao termo e apresentavam fenótipos opostos. Os ginogenotos apresentavam um desenvolvimento embrionário relativamente normal, embora os embriões fossem pequenos, mas o desenvolvimento dos tecidos extra-embrionários apresentava-se extremamente deficiente. Contrariamente, os androgenotos apresentavam um melhor desenvolvimento dos tecidos extra-embrionários mas um retardado desenvolvimento do embrião. Estes resultados sugeriram que os genomas parentais não eram equivalentes e que podiam funcionar de modo diferente dependendo da sua origem, materna ou paterna, sendo ambos essenciais para uma embrionogénese normal (Barton *et al.*, 1984). Na década de 90 foram identificados os primeiros genes *imprinted*, os quais apresentavam de facto expressão diferencial nos cromossomas maternos e paternos (Reik & Walter, 2001).

### 1.2.1 Ciclo de Vida das Marcas de *Imprinting*

A expressão monoalélica dos genes *imprinted* depende de uma marca epigenética que permita distinguir a origem parental de ambos os alelos. Modificações epigenéticas são definidas como alterações químicas do material genético que regulam a função de um gene sem que a sequência de bases no DNA seja alterada. As marcas de *imprinting* têm obrigatoriamente que ser herdadas durante a divisão celular, removíveis durante a gametogênese e ter efeito na expressão gênica. Por reunir todas estas características, a metilação do DNA foi considerada uma excelente candidata a marca de *imprinting* (Wigler *et al.*, 1981; Bird, 1986). Muitos dos genes *imprinted* possuem regiões diferencialmente metiladas (RDM) que apresentam padrões de metilação de citosinas, localizadas em dinucleótidos CpG, diferentes nos alelos materno e paterno, e que influenciam a expressão gênica (Edwards & Ferguson-Smith, 2007).

Os perfis de metilação do DNA genômico são extremamente dinâmicos durante o desenvolvimento de um indivíduo (Figura 3). As marcas de *imprinting* são estabelecidas durante a gametogênese, que consiste no desenvolvimento das células germinativas em espermatozóides ou ovócitos e são mantidas durante a desmetilação global do genoma que ocorre após a fertilização (Reik & Walter, 2001). Nas células primordiais germinativas do novo indivíduo, as marcas de *imprinting* são apagadas, começando o re-estabelecimento numa fase posterior, de acordo com o sexo do feto. Nos ovócitos, a metilação *de novo* dos genes *imprinted* ocorre durante a sua fase de crescimento (Lucifero *et al.*, 2004), enquanto na espermatogênese a metilação ocorre antes da meiose (Kerjean *et al.*, 2000).



**Figura 3 – Ciclo de vida das marcas de *imprinting*.** Apagamento, estabelecimento, manutenção e leitura das marcas de *imprinting* em dois centros de *imprinting* (CI1 e CI2). Cinzento indica modificação epigenética no CI no alelo materno (vermelho) e paterno (azul). A leitura dos genes *imprinted* está assinalada pelas setas (adaptado de Reik & Walter, 2001).

### 1.2.2 Metiltransferases do DNA

A metilação é estabelecida e mantida por um grupo de enzimas denominadas metiltransferases do DNA (DNMTs). Estas podem ser divididas em três famílias: DNMT1, DNMT2 e DNMT3. Enzimas pertencentes às famílias Dnmt1 e Dnmt3 foram identificadas como possuindo actividade catalítica activa, sendo a família Dnmt3 responsável por estabelecer novos perfis de metilação, enquanto a família Dnmt1 mantém estes perfis durante a replicação do DNA nas divisões celulares por mitose (Swales & Spears, 2005). Foram identificadas 3 variantes, resultantes de *splicing* alternativo, da família Dnmt1 em ratinho: Dnmt1s, Dnmt1p e Dnmt1o. A forma mais comum é a Dnmt1s que se encontra nas células somáticas e possui um papel vital no desenvolvimento. As variantes Dnmt1p e

Dnmt1o são específicas de células germinativas e são isoformas da enzima DNMT1 (Mertineit *et al.*, 1998). A forma Dnmt1p é encontrada em espermátócitos enquanto a variante Dnmt1o apenas foi identificada em ovócitos e em embriões na fase de pré-implantação (Swales & Spears, 2005).

Inicialmente, não foi detectada na enzima Dnmt2 função de metilação activa, mas um estudo recente demonstrou que enzima DNMT2 humana metila um RNA de transferência do ácido aspártico (Goll *et al.*, 2006).

Como referido anteriormente, a família Dnmt3 é responsável pela metilação *de novo*. As formas Dnmt3a e Dnmt3b apresentam um elevado grau de homologia, mas os seus padrões de expressão são diferentes durante o desenvolvimento (Swales & Spears, 2005).

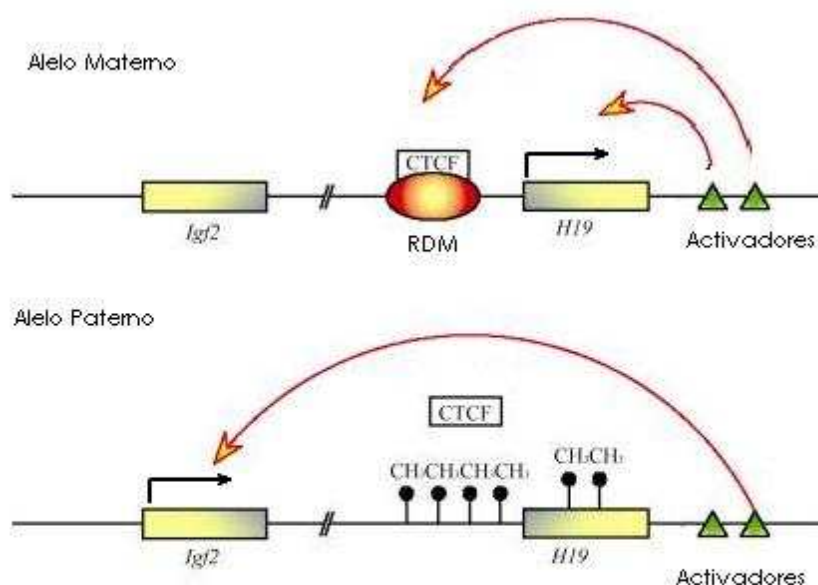
### 1.2.3 Genes *Imprinted*

Até à data, foram descritos em ratinhos cerca de 80 genes *imprinted* ([www.har.mrc.ac.uk](http://www.har.mrc.ac.uk)) e em humanos cerca de 50 ([www.geneimprint.com](http://www.geneimprint.com)). Os genes *imprinted* encontram-se, em grande parte, organizados em *clusters* que contêm genes expressos maternalmente e paternalmente (Reik & Walter, 2001). A maioria dos genes *imprinted* apresentam o alelo materno metilado, enquanto apenas três possuem metilação no alelo paterno (Li *et al.*, 2004).

#### 1.2.3.1 Genes *H19* e *IGF2*

Os genes *H19* e *IGF2* são dois genes *imprinted* que se encontram situados na região cromossómica 11p15.5 ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), sendo o primeiro, um dos três genes que apresenta metilação no alelo paterno (Li *et al.*, 2004). Estes dois genes estão estreitamente ligados, uma vez que são reciprocamente expressos, isto é, o gene *H19* é expresso maternalmente e o *IGF2* paternalmente. A expressão é regulada através da ligação da proteína CTCF (*CCCTC-binding factor*) à região diferencialmente metilada (RDM) localizada entre os dois genes (Gabory *et al.*, 2006) (Figura 4). Na presença de metilação (alelo paterno), a proteína CTCF perde o acesso à RDM, o que permite a interacção entre os activadores (*enhancers*) comuns e o gene *IGF2*, resultando na sua expressão e inactivação do *H19* (devido ao seu promotor também se encontrar metilado).

Pelo contrário, na ausência de metilação na RDM (alelo materno), a ligação da CTCF impede o acesso das regiões ativadoras ao promotor do *IGF2*, reprimindo a sua transcrição, e permitindo a expressão do gene *H19* (Arney, 2003). Dos sete locais de ligação da CTCF, apenas a metilação do local-6 influencia determinantemente a expressão dos dois genes (Takai *et al.*, 2001).



**Figura 4 – Regulação da expressão dos genes *H19* e *Igf2*. Círculos pretos DNA metilado. As setas pretas indicam actividade de transcrição do gene. As setas vermelhas indicam o acesso aos activadores (adaptado de Munshi & Duvvuri, 2007).**

A ligação da proteína CTCF ao alelo materno desempenha um papel importante ao proteger a RDM do *H19* de adquirir metilação de novo nos ovócitos (Fedoriw *et al.*, 2004) e também em mantê-la desmetilada em embriões pós-implantação, permitindo uma expressão normal do gene *H19* (Schoenherr *et al.*, 2003).

O gene *H19* foi descrito como gene *imprinted* pela primeira vez em 1991, através de estudos em ratinho que demonstraram que este gene é preferencialmente expresso a partir da cópia materna (Bartolomei *et al.*, 1991). O gene *H19* humano é um fragmento com 2.7 kb, inclui 4 intrões (Brannan *et al.*, 1990) e 5 exões (NC\_000011.8) e transcreve para um mRNA não codificante com 2.3 kb que é expresso durante a embriogénese, sendo um dos mRNAs mais abundantes no embrião de ratinho ([www.har.mrc.ac.uk](http://www.har.mrc.ac.uk)). Nos humanos, o gene

*H19* também apresenta expressão monoalélica em diversos órgãos, no entanto apresenta expressão bialélica na placenta em estádios precoces (Zhang & Tycko, 1992) e monoalélica após as 10 semanas de gestação (Jinno *et al.*, 1995).

A função do gene *H19* permanece desconhecida. Contudo é pouco provável que o mRNA do gene *H19* traduza uma proteína, uma vez que este não se associa com a maquinaria de transcrição no citoplasma e não possui uma *open reading frame* (ORF) conservada em ratinhos ou em humanos (Brannan *et al.*, 1990). O gene *H19* foi descrito como um gene supressor de tumores (Hao *et al.*, 1993). Contudo, um estudo posterior sugeriu que o gene *H19* pode transcrever para um RNA oncofetal (Ariel *et al.*, 1997).

A metilação do DNA foi sugerida como sendo a marca de *imprinting* do gene *H19* (Ferguson-Smith *et al.*, 1993). Foi demonstrado que, em ratinho, esta marca se encontra localizada a jusante do local de transcrição e que a metilação diferencial estabelecida durante a gametogénese é preservada no desenvolvimento pré-implantação (Bartolomei *et al.*, 1993; Tremblay *et al.*, 1995). Esta região situa-se 2 kb a jusante do local de transcrição do *H19* (Hamatani *et al.*, 2001) e foi confirmado como estando metilada nos espermatozóides e desmetilada nos ovócitos (Olek & Walter, 1997). Relativamente ao gene *H19* humano, a marca de *imprinting* consiste na metilação de uma região que se estende entre -2.0 a -3.3 kb em relação ao local de transcrição (Jinno *et al.*, 1996).

#### **1.2.3.2 Genes *MEST*/*PEG1***

O gene *MEST* (*Mesodermal specific transcript*) ou *PEG1* (*Paternally expressed gene 1*) está localizado na região cromossômica 7q32 e é maioritariamente expresso, através da cópia paterna, em tecidos com componentes mesodermas (Nishita *et al.*, 1996).

O gene *MEST* humano apresenta cerca de 70% de homologia com o gene de ratinho (Nishita *et al.*, 1996), e a proteína humana aproximadamente 98% de identidade com a de ratinho (Riesewijk *et al.*, 1997).

A expressão monoalélica do gene *MEST* foi observada em quase todos os tecidos analisados excepto no sangue, no qual apresenta expressão bialélica (Lefebvre *et al.*, 1997; Riesewijk *et al.*, 1997). Foi demonstrado que na presença de



mutação, este gene causa um crescimento deficiente de estruturas embrionárias e extra-embrionárias e uma resposta anormal por parte da mãe aos recém-nascidos (Lefebvre *et al.*, 1998). A perda de *imprinting* do gene *MEST*, causando expressão bialélica, foi descrita em cancro da mama (Pedersen *et al.*, 2002).

Outro estudo revelou que o gene *MEST* origina o transcrito *MESTIT1* (*MEST* Intronic Transcript 1), que é expresso apenas a partir do alelo paterno e que este transcrito teria um papel de regulação na expressão do gene *MEST* durante o desenvolvimento (Nakabayashi *et al.*, 2002). O transcrito tem expressão predominantemente testicular e em espermatozóides maduros móveis, sugerindo a possibilidade de desempenhar um papel na fisiologia do sêmen humano e na fertilização (Li *et al.*, 2002).

### 1.3 *Imprinting* Genómico na Espermatogénese

Nas células germinativas masculinas as marcas de *imprinting* herdadas são apagadas e são re-estabelecidas as marcas específicas do alelo paterno. O gene *H19* possui metilação nos gâmetas masculinos, tendo já sido bem caracterizada a aquisição da metilação na espermatogénese de ratinho. A metilação do gene *H19* é adquirida diferencialmente nos alelos parentais, sendo o alelo paterno re-metilado antes do alelo materno. Foi demonstrado que o alelo paterno adquire metilação nas espermatogónias A, enquanto o alelo materno não apresenta a metilação completa antes do final da meiose I (Davis *et al.*, 1999). Foi ainda descrito que genes *imprinted* com metilação no alelo paterno já possuíam a marca de *imprinting* no estadio de espermatócito em paquíteno (Oakes *et al.*, 2007).

Na espermatogénese humana, foi descrito que as marcas de *imprinting* já se encontram correctamente apagadas nas espermatogónias fetais e que a metilação do gene *H19* já se encontra estabelecida antes das células entrarem em meiose (Kerjean *et al.*, 2000).

Como referido anteriormente, as enzimas DNMTs possuem um papel importante na metilação do DNA. O mRNA da DNMT1 encontra-se presente em espermatogónias A e B, em espermatócitos e em espermatídeos redondos, tendo sido descrita uma forma específica desta enzima limitada aos espermatócitos na fase de paquíteno (Jue *et al.*, 1995). Embora o mRNA se encontre presente nestes estadios, a proteína DNMT1 apenas existe no núcleo das espermatogónias e no citoplasma dos espermatídeos redondos (Omisanjo *et al.*, 2007).

Em ratinho, os perfis de expressão das enzimas Dnmt3a e Dnmt3l em testículos fetais, sugerem que estas possam interagir para estabelecer a metilação. Adicionalmente, os níveis de expressão de DNMT1 e DNMT3b em período pós-natal sugere um papel de manutenção da metilação na proliferação das espermatogónias, por parte destas enzimas (La Salle *et al.*, 2004). Apesar de a Dnmt1 estar associada à manutenção da metilação, foi sugerido que esta enzima pode ser responsável pela propagação da metilação numa região que já se encontre parcialmente metilada, agindo assim como uma metiltransferase *de novo* (Warnecke *et al.*, 1998; Fatemi *et al.*, 2001). Esta

actividade foi observada mesmo na ausência das enzimas Dnmt3a e Dnmt3b, conhecidas como metiltransferases *de novo* (Lorincz *et al.*, 2002).

Um factor denominado BORIS (*Brother Of the Regulator of Imprinting Sites*), com expressão testicular, poderá também estar envolvido no estabelecimento da metilação durante a diferenciação celular da linha germinal masculina. Em células CTCF negativas foi observada uma activação do factor BORIS, e em células BORIS negativas uma regulação de CTCF, em associação com a eliminação e restabelecimento das marcas de metilação, respectivamente (Loukinov *et al.*, 2002).

Erros no estabelecimento das marcas de *imprinting* foram associados a espermatogénese anormal. Foi já descrito que pacientes com oligozoospermia e azoospermia devido a hipoplasia germinativa apresentam perda de metilação no gene *H19* e no local de ligação 6 da proteína CTCF (Marques *et al.*, 2004, 2008, 2009; Kobayashi *et al.*, 2007) e aquisição de metilação no gene *MEST* (Kobayashi *et al.*, 2007; Marques *et al.*, 2008). Outro estudo revelou elevados níveis de metilação do gene *MEST* de pacientes com parâmetros anormais na análise de sémen (Houshdaran *et al.*, 2007). Adicionalmente, ratinhos *knockout* para a enzima Dnmt3L apresentam paragem de maturação em espermátócitos primários e erros de *imprinting* do gene *H19* em mosaicismo (Webster *et al.*, 2005). Adicionalmente, em homens inférteis com paragem de maturação em espermátídeos redondos, apenas os espermátócitos na fase de paquíteno apresentam sinais positivos para a proteína DNMT1, enquanto os espermátídeos redondos permanecem imunonegativos (Omisanjo *et al.*, 2007).

## Objectivos

Com o presente trabalho pretendeu-se estudar, pela primeira vez, os perfis de metilação dos genes *imprinted* *H19* e *MEST*, de células da espermatogénese humana adulta isoladas por micromanipulação de biópsias testiculares de pacientes com azoospermia secretora devido a paragem de maturação meiótica (PM). Este estudo dos padrões de metilação permitirá averiguar se os pacientes com PM não pura apresentam diferenças nas marcas de *imprinting* comparativamente com os casos de PM pura.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

---

Encontram-se na Tabela 2 os reagentes utilizados neste trabalho.

**Tabela 2 – Reagentes utilizados na realização deste trabalho.**

Reagentes	Marca
Agar	Quilaban
Água bidestilada estéril	BBraun
Ampicilina	AppliChem
Colagenase-IV	Sigma
Conjunto de dNTP (100mM)	Invitrogen
DNase	Qiagen
DTT ( <i>Dithio-threitol</i> )	Invitrogen
EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético)	Sigma
EpiTect Bisulfite kit	Qiagen
Etanol absoluto PA	Panreac
GFX PCR-DNA Purification Kit	Amersham Biosciences
HCl (Ácido clorídrico 37%, <i>pro analysi</i> )	Merck
HotStar Taq DNA Polimerase	Qiagen
IPTG ( <i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i> )	Sigma
Marcador de 100pb	Invitrogen
Meio IVF ( <i>In Vitro Fertilization</i> )	Medicult
KCl (Cloreto de Potássio, <i>pro analysi</i> )	Merck
KOH (Hidróxido de Potássio, <i>pro analysi</i> )	Merck
Meio LB	Quilaban
Óleo Mineral Leve	Medicult
Primers H19 e MEST	Thermo Electron
Primers M13	Thermo Electron
Sperm Preparation Medium (SPM)	Medicult
Taq Polimerase	Fermentas
TOPO TA Cloning kit com <i>E.coli</i> Mach1-T1	Invitrogen
Tris-HCl ( <i>TRIZMA Hydrochloride</i> )	Sigma
X-Gal ( <i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside</i> )	Sigma

## 2.1 Selecção de Pacientes

Neste trabalho foram analisadas células da espermatogénese humana adulta (100-800 células), isoladas por micromanipulação, a partir de biópsias testiculares de pacientes com azoospermia secretora devido a paragem de maturação meiótica (PM) conforme descrito anteriormente (Sousa *et al.*, 2002).

Em resumo, o tecido testicular foi recolhido em SPM (*Sperm Preparation Medium*, Medicult), dissociado mecanicamente com bisturi e lavado em SPM. Seguiu-se a dissociação celular enzimática por incubação em SPM contendo 25 µg/mL de DNase e 1000 U/mL de colagenase-IV (Sigma) durante 1h a 37°C. Após a lavagem em SPM, o *pellet* foi ressuscitado em meio IVF (Medicult) e incubado até ser usado (30-32°C, 5% CO<sub>2</sub>). Uma porção da suspensão celular foi posteriormente diluída em SPM, colocada numa placa de cultura e revestida com óleo mineral leve (Medicult). Os espermatócitos primários e secundários, os espermátides redondos e os alongados/espermatozóides foram seleccionados individualmente num microscópio Nikon invertido, equipado com óptica Hoffman e estativo térmico (32°C), utilizando micromanipuladores Narishige e micropipetas com 15-20 µm de diâmetro (Swemed).

Os pacientes foram divididos em dois grupos: PMs puras (N=7) e PMs não puras (N=8). Para as PMs puras foi estudado o perfil de metilação dos espermatócitos primários e em dois destes pacientes foi ainda possível analisar os perfis de células de Sertoli. Para as PMs não puras foram estudados os perfis de metilação de células pré-meióticas (espermatócitos primários para todos os pacientes e células de Sertoli em um paciente) e pós-meióticas (espermatócitos secundários, espermátides redondos e espermátides alongados/espermatozóides), quando a disponibilidade de material o permitiu.

## 2.2 Extração de DNA

O DNA foi extraído pela adição de 10µL de tampão de lise alcalina (1 M KOH; 0,05 M DTT), seguindo-se uma incubação de 20 minutos a 80°C. A reacção foi parada através da adição de 10µL de tampão de neutralização (0,9 M Tris-HCl pH8.3; 0,3 M KCl; 0,2 M HCl).

### 2.3 Tratamento com Bissulfito de Sódio

O DNA extraído foi submetido a tratamento com bissulfito de sódio, utilizando o EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen), de modo a converter as citosinas não metiladas em uracilo, permanecendo as citosinas metiladas inalteradas (Figura 5), de acordo com as instruções do fabricante (para protocolo detalhado ver ANEXO I). Este protocolo inclui a purificação do DNA resultante do tratamento com bissulfito de sódio, de modo a remover sais de bissulfito e químicos utilizados no processo de conversão que podem inibir reacções de PCR e sequenciação.



Figura 5 – Conversão de citosinas pelo tratamento com Bissulfito de Sódio.

### 2.4 Amplificação dos genes *H19* e *MEST*

As regiões diferencialmente metiladas (RDM) dos genes de interesse para este estudo, *H19* e *MEST*, foram amplificados através da técnica de *hemi-nested* PCR, utilizando *primers* específicos (Kerjean *et al.*, 2000).

A técnica *hemi-nested* PCR tem como base a técnica de PCR clássica, com a variante de que os produtos resultantes da primeira amplificação são utilizados como alvo numa segunda reacção. Nesta segunda amplificação é mantido um dos *primers* da primeira reacção, sendo o outro substituído por um mais interno.

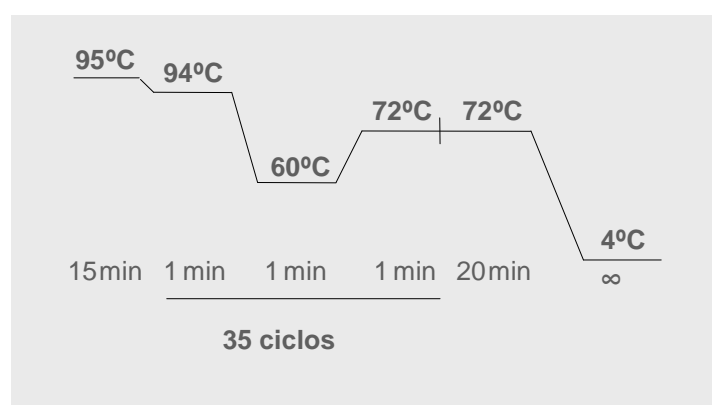
Para o gene *H19* foram analisadas 18 CpGs da RDM de uma sequência com 231 pares de bases (pb). A região amplificada para o gene *MEST* permite a análise de 22 CpGs da RDM de uma sequência com 219 pb.

1ª Reacção (PCR *single*)

A primeira reacção de PCR foi realizada com os *primers* descritos na Tabela 3 (em que Y representa uma mistura de C+T, permitindo que o *primer* se ligue tanto em caso de metilação como de desmetilação da citosina correspondente). Foi preparada, para cada gene, uma mistura de reacção com um volume total de 50µL contendo tampão 1x com 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Qiagen); 0.12 mM de cada dNTP (Invitrogen); 0.5 µM de cada *primer*; 1.5U de enzima Taq HotStar (5U/µL, Qiagen) e 10µL de DNA tratado. As condições de PCR encontram-se ilustradas na Figura 6.

**Tabela 3 – Primers utilizados na 1ª reacção de PCR e respectivas sequências.**

Primers	
H19	MEST
<b>F6005</b> – 5'-AGG TGT TTT AGT TTT ATG GAT GAT GG-3'	<b>F609</b> – 5'-TYG TTG TTG GTT AGT TTT GTA YGG TT-3'
<b>R6326</b> – 5'-CC TAT AAA TAT CCT ATT CCC AAA TAA CC-3'	<b>R898</b> – 5'-AAA AAT AAC ACC CCC TCC TCA ATT-3'



**Figura 6 – Programa da 1ª reacção de PCR.**

2ª Reacção (PCR *hemi-nested*)

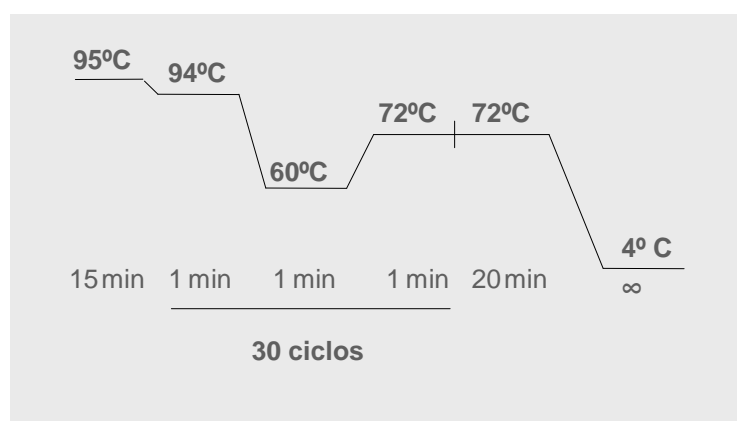
A segunda reacção de PCR foi realizada com os *primers* descritos na Tabela 4. Foi preparada, para cada gene, uma mistura de reacção com um



volume total de 50µL contendo tampão 1x com 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.12 mM de cada dNTP; 0.5 µM de cada *primer*; 1.5U de enzima Taq HotStar (5U/µL) e 1µL do produto da 1ª reacção de PCR. As condições de PCR encontram-se ilustradas na Figura 7.

**Tabela 4 – Primers utilizados na 2ª reacção de PCR e respectivas sequências.**

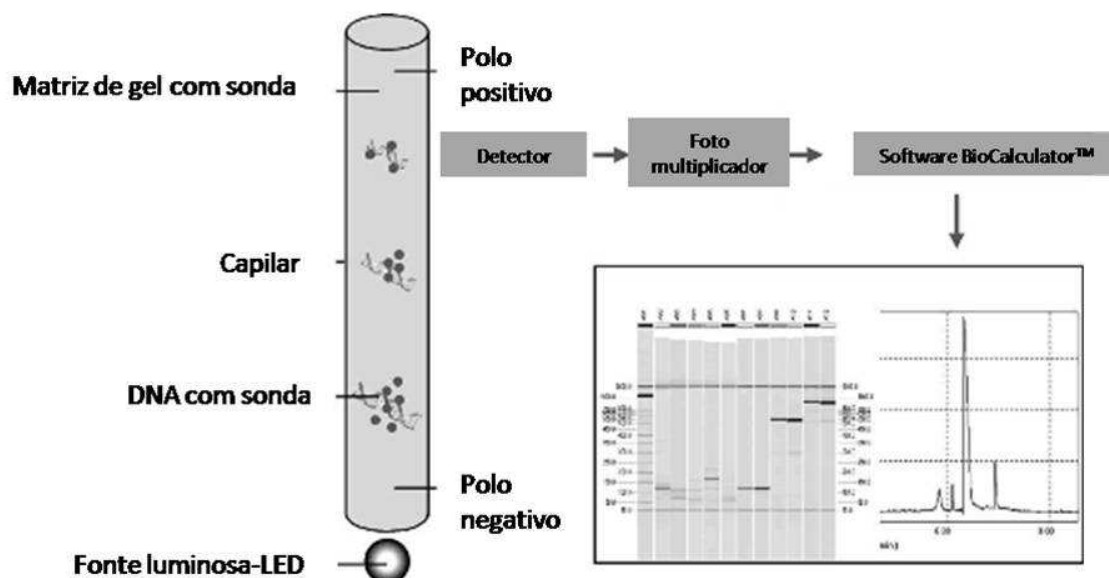
Primers	
<i>H19</i>	<i>MEST</i>
<b>F6115</b> – 5'-TGT ATA GTA TAT GGG TAT TTT T GGA GGT TT-3'	<b>F609</b> – 5'-TYG TTG TTG GTT AGT TTT GTA YGG TT-3'
<b>R6326</b> – 5'-CC TAT AAA TAT CCT ATT CCC AAA TAA CC-3'	<b>R827</b> – 5'-CCC AAA AAC AAC CCC AAC TC-3'



**Figura 7 – Programa da 2ª reacção de PCR.**

## 2.5 Electroforese Capilar

De modo a verificar se o fragmento de interesse tinha sido amplificado, os produtos resultantes das reacções de PCR foram analisados num novo sistema de electroforese capilar, o QIAxcel (Qiagen, Hilden) com o respectivo *kit* (QIAxcel Gel Cartridge e reagentes) (Qiagen, Hilden) (Figura 8).



**Figura 8 – Esquema do funcionamento do sistema QIAxcel (Adaptado de <http://www1.qiagen.com/Products/QIAxcelDNAkits.asp>).**

Este aparelho utiliza a electroforese capilar que permite a rápida separação de fragmentos de ácidos nucleicos. Ao contrário da electroforese em gel de agarose tradicional, este sistema utiliza cartuchos de 12 capilares. As amostras são injectadas individualmente pelos capilares de forma automática e é aplicada uma voltagem fixa. O DNA carregado negativamente, migra ao longo do capilar até ao pólo positivo. Assim, tal como acontece num gel de agarose, as moléculas de menor peso molecular migram mais rapidamente que as de maior peso molecular. Dentro do capilar existe uma matriz com uma sonda que se liga às moléculas de DNA ou RNA. À medida que as amostras migram ao longo do capilar, passam por um detector que detecta e mede a intensidade de fluorescência emitida pela sonda ligada às moléculas de ácidos nucleicos. Um fotomultiplicador converte o sinal de fluorescência num impulso eléctrico que é posteriormente transferido para um computador e processado pelo software BioCalculator™ (Qiagen). Após o processamento, os dados são expostos num electroforograma ou numa imagem virtual de um gel.

Foi utilizado o cartucho *Screening* (QIAxcel DNA Screening Kit, Qiagen) que permite a separação de fragmentos com uma resolução de 20 pb durante 5 minutos e 20 segundos a uma voltagem de 6 kV.

## 2.6 Purificação dos produtos de PCR

O DNA resultante da amplificação foi purificado utilizando o GFX PCR-DNA Purification Kit (Amersham Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante, de modo a remover reagentes utilizados na reacção de PCR, como por exemplo *primers* e dNTPs em excesso, que podem inibir a reacção clonagem (para protocolo detalhado ver ANEXO II).

## 2.7 Clonagem Molecular

Para a realização do estudo dos perfis de metilação de cada fragmento do produto de PCR individualmente, foi utilizada a técnica de clonagem molecular com o kit TOPO TA Cloning (Invitrogen) com *Escherichia coli* Mach1-T1 (Invitrogen) e vector pCRII-TOPO (Invitrogen) (Figura 9), de acordo com as instruções do fabricante (para protocolo detalhado ver ANEXO III).

O vector fornecido com o kit possui resíduos de timina (T) na terminação 3'. Logo, para uma ligação mais eficiente do fragmento de PCR ao vector, foi realizada primeiramente uma reacção de adição de adeninas (A) para o produto de PCR apresentar resíduos de adenina na terminação 3'. Uma mistura contendo 3.5 µL de produto de PCR purificado; tampão 1x (Fermentas); 0.6 µM dATPs; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas); 1U de Taq DNA polimerase (5 U/µL, Fermentas) foi incubada a 72°C durante 15 minutos. Seguidamente, procedeu-se à realização da reacção de clonagem e à transformação de células competentes de *E. coli*.

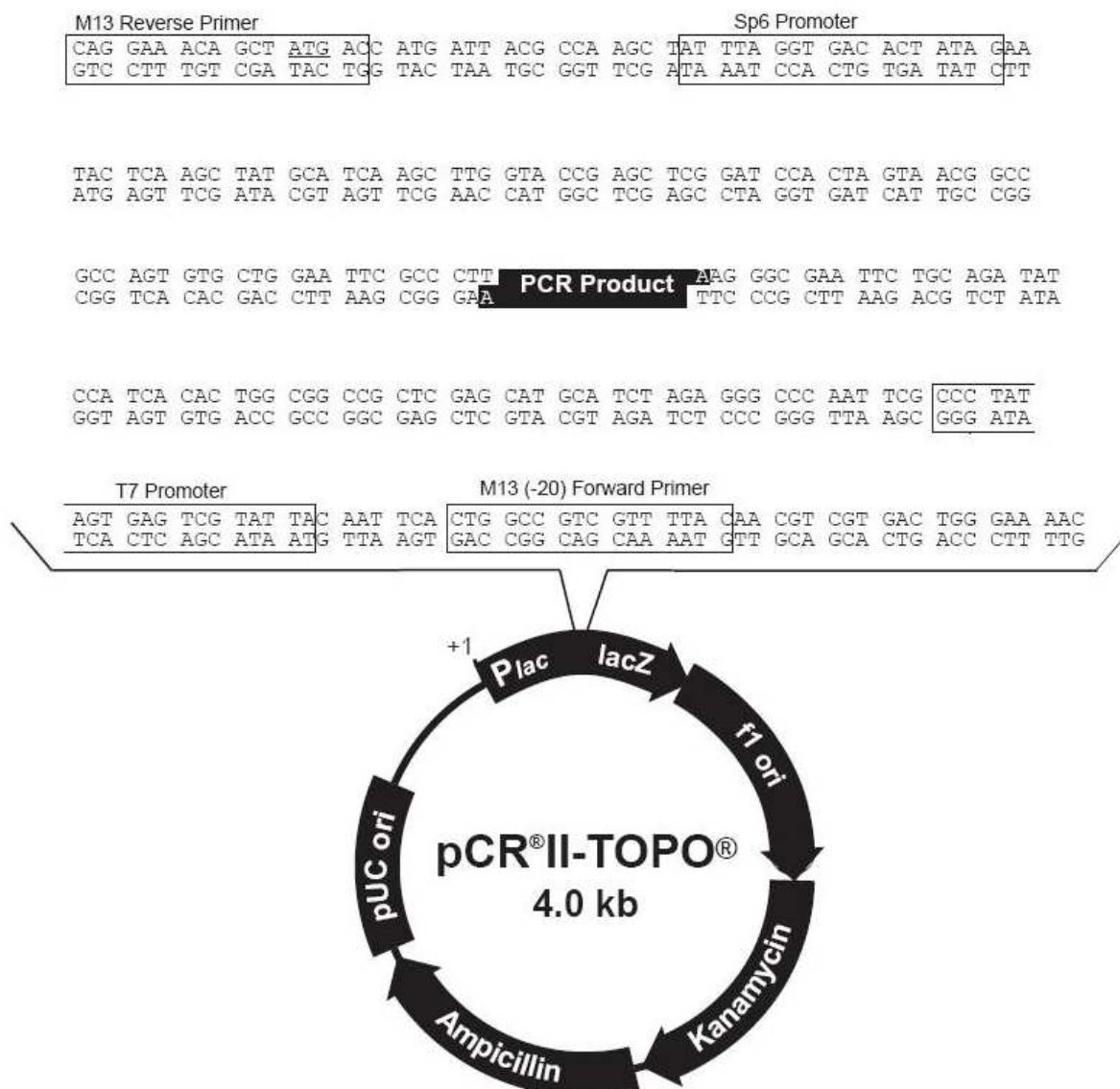


Figura 9 – Mapa do vector pCRII-TOPO (Adaptado de [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcrriitopo\\_map.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcrriitopo_map.pdf)).

O vector pCRII-TOPO possui o gene lacZ (Figura 9) que quando expresso produz a proteína  $\beta$ -galactosidase que degrada o composto X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside), tornando as colónias azuis. Quando um fragmento é inserido entre o promotor e o gene, este deixa de ser expresso, ou seja, não é produzida a proteína  $\beta$ -galactosidase, o X-Gal não é degradado e as colónias permanecem brancas. Deste modo, é possível uma rápida detecção das colónias de bactérias que possuem o fragmento de estudo. Adicionalmente,

o plasmídeo possui o gene que confere resistência à ampicilina, sendo que só as bactérias que incorporaram o plasmídeo vão ser capazes de crescer num meio de cultura selectivo, contendo ampicilina. Assim, a selecção dos clones bacterianos que incorporaram o plasmídeo contendo o fragmento de interesse foi realizada utilizando meio de cultura selectivo LB-Agar (Quilaban) com ampicilina (50µg/mL, AppliChem) e X-Gal (40mg/mL, Sigma). Para cada amostra foram seleccionados e analisados entre 10 a 20 clones.

## 2.8 Amplificação do plasmídeo contendo o fragmento inserido com os *primers* M13

A presença do fragmento de interesse foi confirmada utilizando os *primers* M13 *forward* e *reverse* que emparelham com parte da sequência do plasmídeo, originando um produto que contém o fragmento inserido e as regiões flangeadoras do plasmídeo (Figura 9). Para cada clone foi preparada uma mistura de reacção com um volume total de 50µL contendo tampão 1x (Fermentas); 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas); 0.1 mM de cada dNTPs; 0.25 pmol/µL de cada *primer*, M13F e M13R; 1U de Taq DNA polimerase (5 U/µL, Fermentas) e 10µL de suspensão de bactérias. As condições de PCR encontram-se ilustradas na Figura 10.

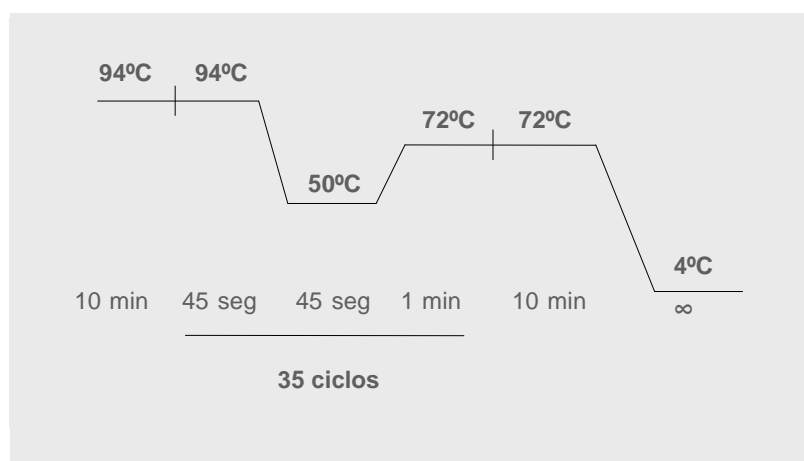
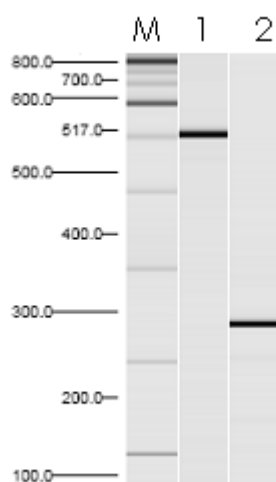


Figura 10 – Programa da reacção de PCR M13.

Após a amplificação, os produtos foram sujeitos a electroforese capilar para verificar se os clones possuíam realmente o fragmento inserido. Na Figura 11 encontra-se, como exemplo, um electroforograma de uma amostra cujo plasmídeo incorporou o fragmento em estudo (linha 1), e outra de um plasmídeo sem o fragmento inserido (linha 2).



**Figura 11 – Electroforograma de produtos resultante da amplificação do plasmídeo após clonagem. M – marcador de 100 pb; 1 – plasmídeo com fragmento inserido; 2 - plasmídeo sem fragmento inserido.**

## 2.9 Sequenciação

Após se ter verificado que os clones possuíam o fragmento em estudo, estes foram sequenciados (10-20 clones por amostra), utilizando o ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As amostras foram enviadas para sequenciação para CoGenics (França). A sequenciação directa das amostras antes da clonagem foi também realizada de modo a assegurar a ausência de enviesamento na clonagem e para determinar os níveis globais de metilação. As amostras para sequenciação directa foram enviadas para a Stabvida (Portugal). A metilação das CpGs presentes nas sequências foram analisadas manualmente e utilizando o software BiQ Analyzer (Bock *et al.*, 2005).

## **2.10 Análise estatística**

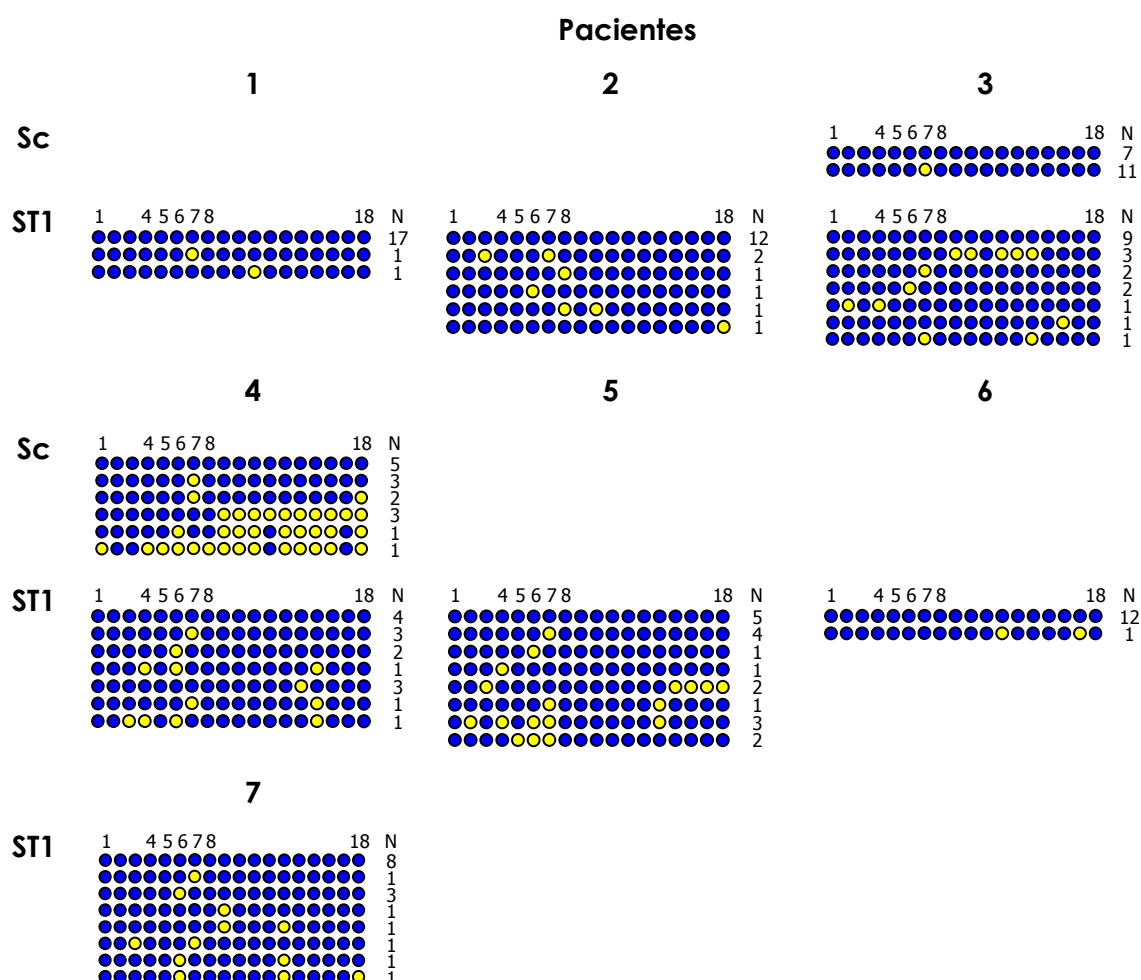
A análise estatística foi realizada utilizando o Teste Exacto de Fisher com duas caudas (SPSS 17.0, Windows). As diferenças com valores de  $p < 0.05$  foram consideradas estatisticamente significantes.

### **3. RESULTADOS**

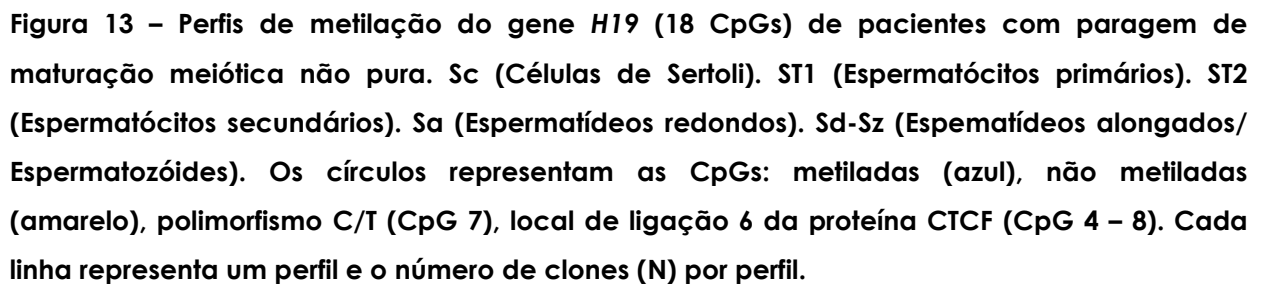
---



Para o gene *H19* foram estudados um total de 498 clones, 153 para paragens de maturação (PM) puras (33 de células de Sertoli e 120 de espermátócitos primários) (Figura 12 e 16) e 345 para PMs não puras (20 de células de Sertoli, 155 de espermátócitos primários, 40 de espermátócitos secundários, 71 de espermátídeos redondos e 59 de espermátídeos alongados/espermatozóides) (Figura 13, 16 e 18). A sequência analisada encontra-se situada na região diferencialmente metilada (RDM) e contém 18 CpGs, incluindo o local de ligação 6 da proteína CTCF (CpG 4-8) e um local polimórfico na CpG 7 (Citosina/Timina), não contabilizado para a análise quantitativa, dado não ser informativo em termos de estado de metilação.



**Figura 12 – Perfis de metilação do gene *H19* (18 CpGs) de pacientes com paragem de maturação meiótica pura. Sc (Células de Sertoli). ST1 (Espermátócitos primários). Os círculos representam as CpGs: metiladas (azul), não metiladas (amarelo), polimorfismo C/T (CpG 7), local de ligação 6 da proteína CTCF (CpG 4 – 8). Cada linha representa um perfil e o número de clones (N) por perfil.**



Na análise da metilação da RDM do gene *H19* a maioria dos pacientes apresentava elevada metilação nas células espermatógenicas (ST1, ST2, Sa e Sd-Sz), sendo esta quase sempre superior a 90%, excepto para estadio Sd-Sz do paciente 13 (10.3%) e no estadio ST1 do paciente 15 (82.1%) (Tabela 5). Nestes dois pacientes é visível a presença de clones completamente metilados e clones completamente desmetilados.

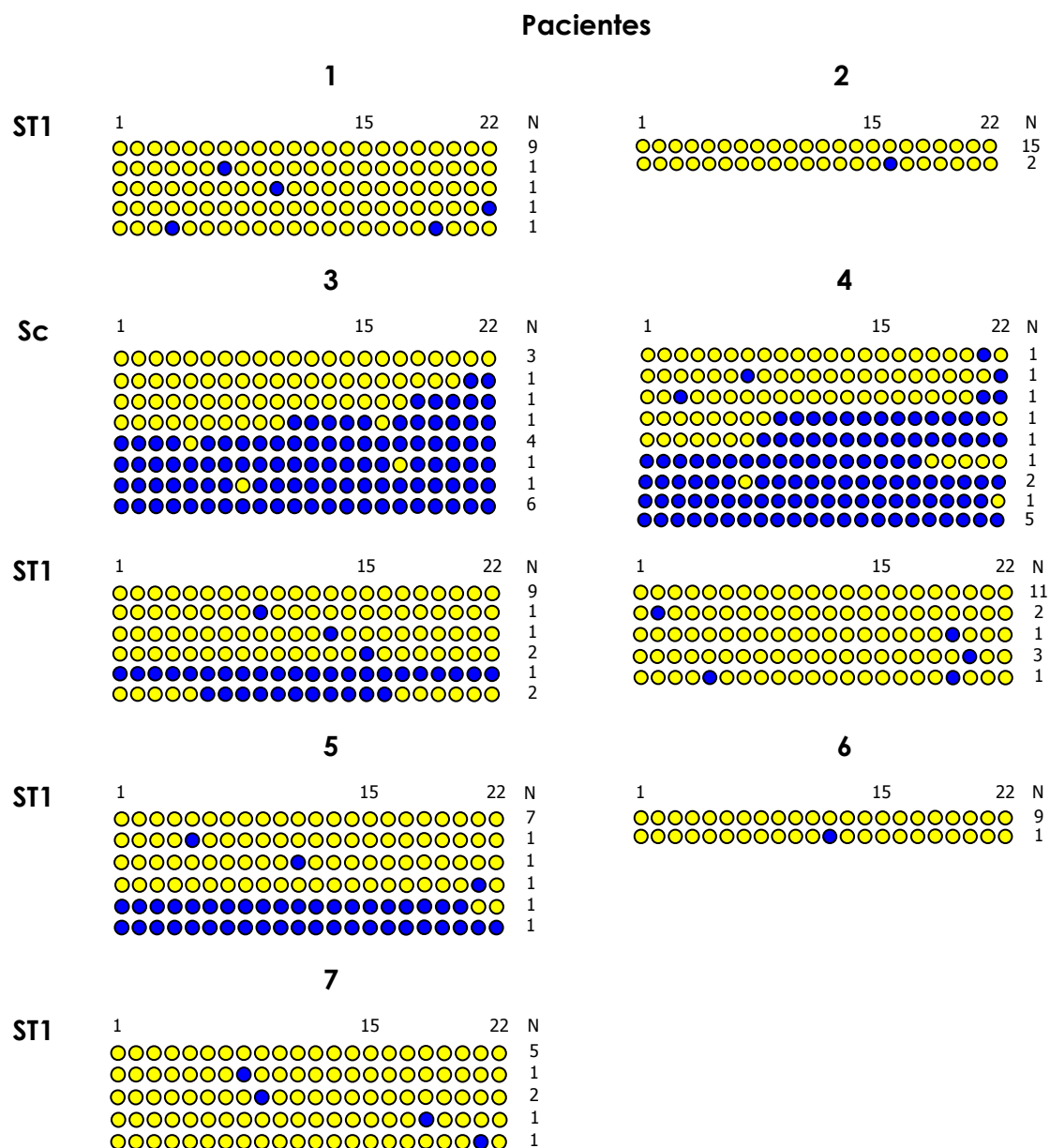
Adicionalmente, foram analisadas células de Sertoli de três pacientes. Os valores de metilação obtidos foram 100.0%, 78.8% e 11.8% para os pacientes 3, 4

e 15, respectivamente. O local de ligação 6 da proteína CTCF destas células apresentava os seguintes valores de metilação: 100.0% no paciente 3, 91.7% no paciente 4 e 10.0% no paciente 15 (Tabela 5).

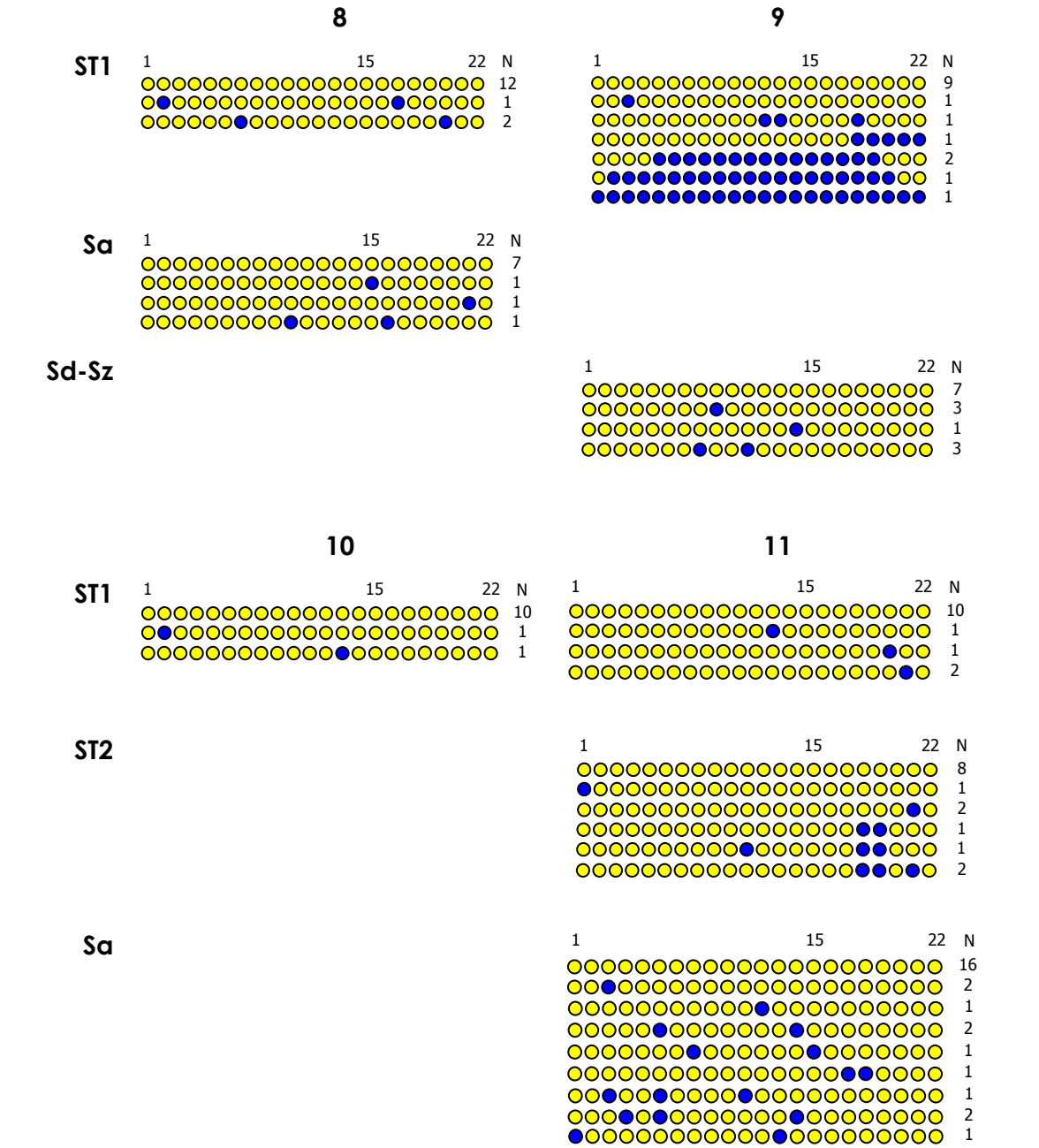
**Tabela 5 – Resultados da metilação do gene *H19* e da desmetilação do gene *MEST*, por paciente.**

				<i>H19</i>		<i>MEST</i>
	Paciente	Tipo de Células	Número de Células	Metilação RDM (%) (CpG metiladas/ total CpG)	Metilação CTCF (%) (CpG metiladas/ total CpG)	Desmetilação RDM (%) (CpG não metiladas/total CpG)
PM Puros	1	ST1	600	<b>99.7</b> (322/323)	<b>100.0</b> (76/76)	<b>98.3</b> (281/286)
	2	ST1	150	<b>97.7</b> (299/306)	<b>95.8</b> (69/72)	<b>99.5</b> (372/374)
	3	Sertoli	100	<b>100.0</b> (306/306)	<b>100.0</b> (72/72)	<b>30.3</b> (120/396)
		ST1	300	<b>93.5</b> (302/323)	<b>96.1</b> (73/76)	<b>86.4</b> (304/352)
	4	Sertoli	100	<b>78.8</b> (201/255)	<b>91.7</b> (55/60)	<b>27.3</b> (84/308)
		ST1	300	<b>94.9</b> (242/255)	<b>90.0</b> (54/60)	<b>98.0</b> (388/396)
	5	ST1	300	<b>91.0</b> (294/323)	<b>84.2</b> (64/76)	<b>83.0</b> (219/264)
PM não Puros	6	ST1	450	<b>99.1</b> (219/221)	<b>100.0</b> (52/52)	<b>99.5</b> (219/220)
	7	ST1	800	<b>95.8</b> (277/289)	<b>92.6</b> (63/68)	<b>97.7</b> (215/220)
	8	ST1	400	<b>95.4</b> (292/306)	<b>94.4</b> (68/72)	<b>98.2</b> (324/330)
		Sa	300	<b>96.9</b> (280/289)	<b>94.1</b> (64/68)	<b>98.2</b> (216/220)
	9	ST1	300	<b>96.3</b> (311/323)	<b>96.1</b> (73/76)	<b>77.3</b> (272/352)
		Sd-Sz	300	<b>100.0</b> (340/340)	<b>100.0</b> (80/80)	<b>96.8</b> (298/308)
	10	ST1	160	<b>100.0</b> (340/340)	<b>100.0</b> (80/80)	<b>99.2</b> (262/264)
	11	ST1	175	<b>96.3</b> (311/323)	<b>93.4</b> (71/76)	<b>98.7</b> (304/308)
		ST2	100	<b>97.6</b> (332/340)	<b>93.8</b> (75/80)	<b>95.8</b> (316/330)
		Sa	200	<b>96.9</b> (280/289)	<b>95.6</b> (65/68)	<b>96.3</b> (572/594)
	12	ST1	200	<b>96.8</b> (329/340)	<b>93.8</b> (75/80)	<b>98.6</b> (217/220)
		Sa	200	<b>96.6</b> (312/323)	<b>96.1</b> (73/76)	<b>98.1</b> (302/308)
	13	ST1	250	<b>97.8</b> (316/323)	<b>90.8</b> (69/76)	<b>100.0</b> (308/308)
		Sd-Sz	100	<b>10.3</b> (35/340)	<b>10.0</b> (8/80)	<b>97.7</b> (301/308)
	14	ST1	400	<b>96.2</b> (327/340)	<b>93.8</b> (75/80)	<b>99.6</b> (241/242)
		ST2	200	<b>96.8</b> (329/340)	<b>93.8</b> (75/80)	<b>99.6</b> (241/242)
		Sa	200	<b>96.4</b> (295/306)	<b>87.5</b> (63/72)	<b>99.7</b> (285/286)
	15	Sertoli	300	<b>11.8</b> (40/340)	<b>10.0</b> (8/80)	<b>40.4</b> (151/374)
		ST1	700	<b>82.1</b> (279/340)	<b>76.3</b> (61/80)	<b>100.0</b> (264/264)
		Sd-Sz	350	<b>97.2</b> (314/323)	<b>90.8</b> (69/76)	<b>99.4</b> (328/330)

Para o gene *MEST* foram estudados um total de 382 clones, 128 para PMs puras (32 de células de Sertoli e 96 de espermátócitos primários) (Figura 14 e 17) e 254 para PMs não puras (17 de células de Sertoli, 104 de espermátócitos primários, 26 de espermátócitos secundários, 64 de espermátídeos redondos e 43 de espermátídeos alongados/espermatozóides) (Figura 15, 17 e 18). A sequência analisada contém 22 CpGs pertencentes à RDM.



**Figura 14 – Perfis de metilação do gene *MEST* (22 CpGs) de pacientes com paragem de maturação meiótica pura. Sc (Células de Sertoli). ST1 (Espermátócitos primários). CpGs: metiladas (azul), não metiladas (amarelo). Cada linha representa um perfil e o número de clones (N) por perfil.**



**Figura 15 – Perfis de metilação do gene *MEST* (22 CpGs) de pacientes com paragem de maturação meiótica não pura. Sc (Células de Sertoli). ST1 (Espermatócitos primários). ST2 (Espermatócitos secundários). Sa (Espermatídeos redondos). Sd-Sz (Espematiódeos alongados/Espermatozóides). Os círculos representam as CpGs: metiladas (azul), não metiladas (amarelo). Cada linha representa um perfil e o número de clones (N) por perfil.**

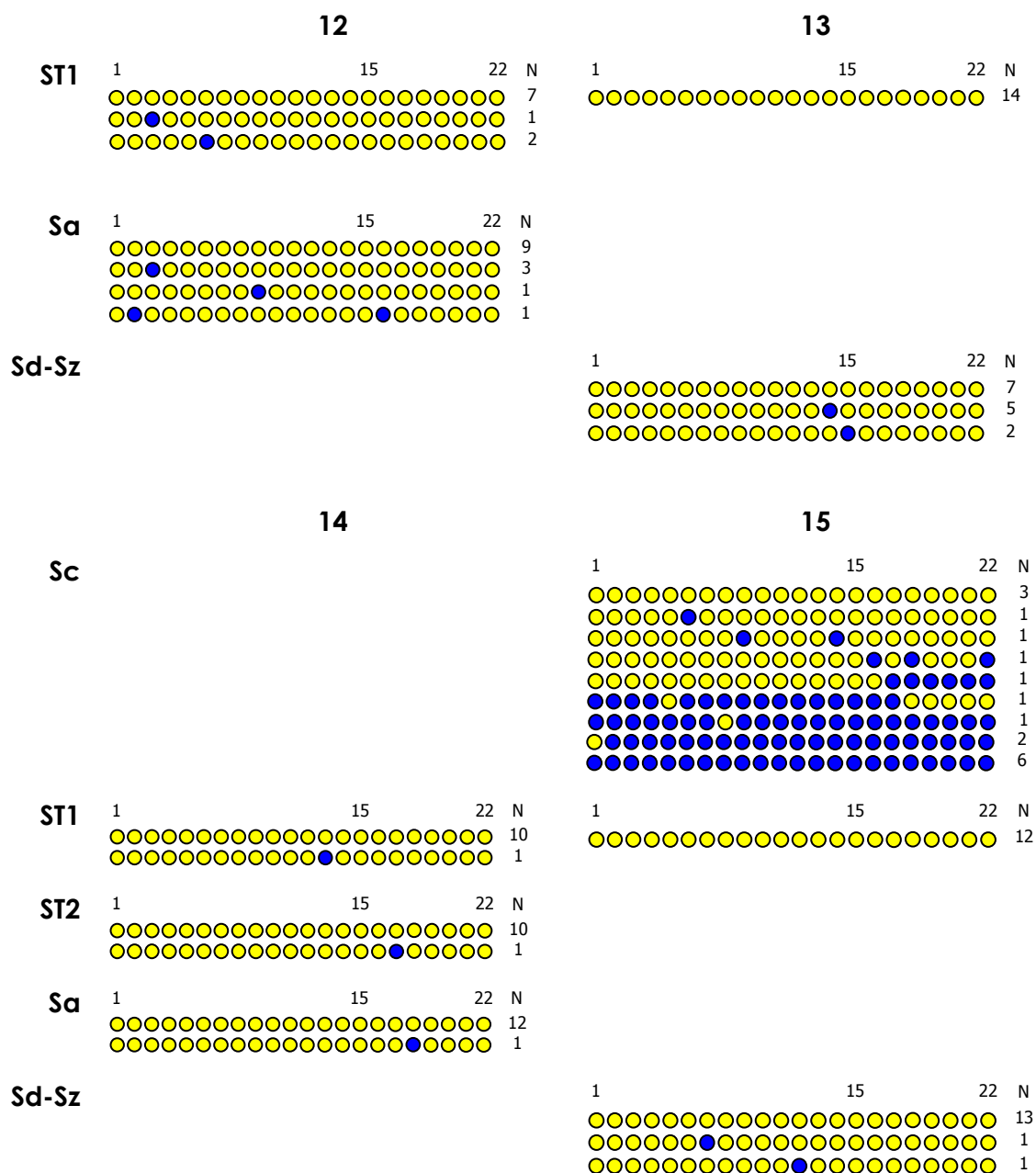
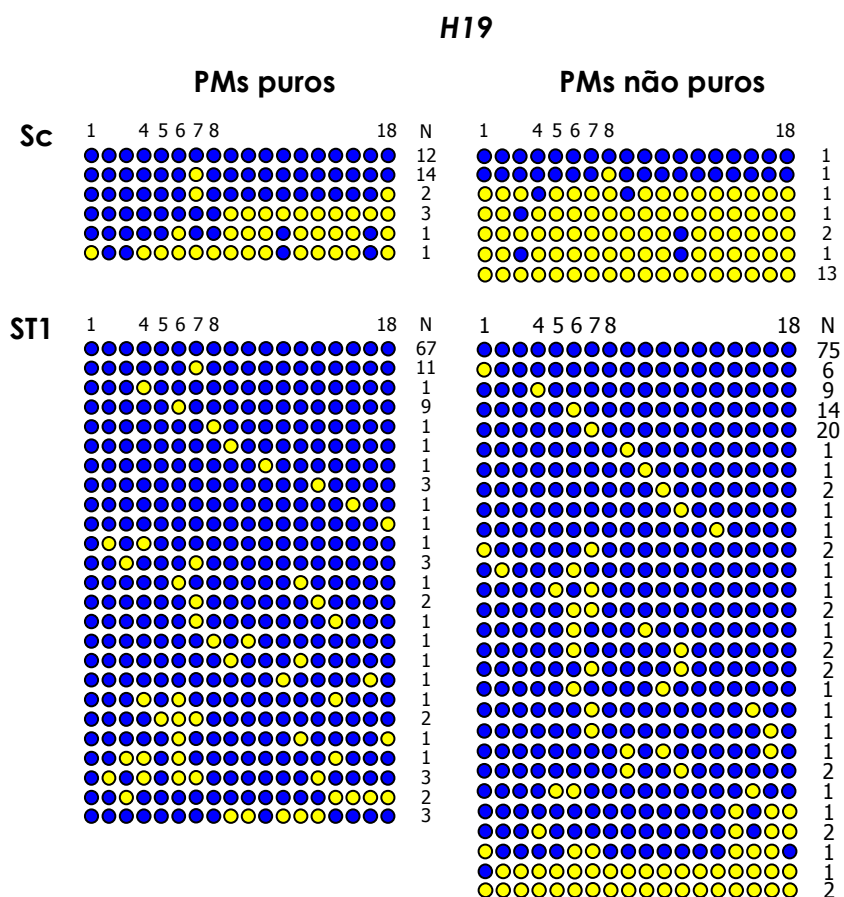


Figura 15 – (continuação).

Na análise da desmetilação da região diferencialmente metilada do gene *MEST* é possível observar, na maioria dos pacientes, elevada desmetilação nas células espermatozóides (ST1, ST2, Sa e Sd-Sz), sendo esta quase sempre superior

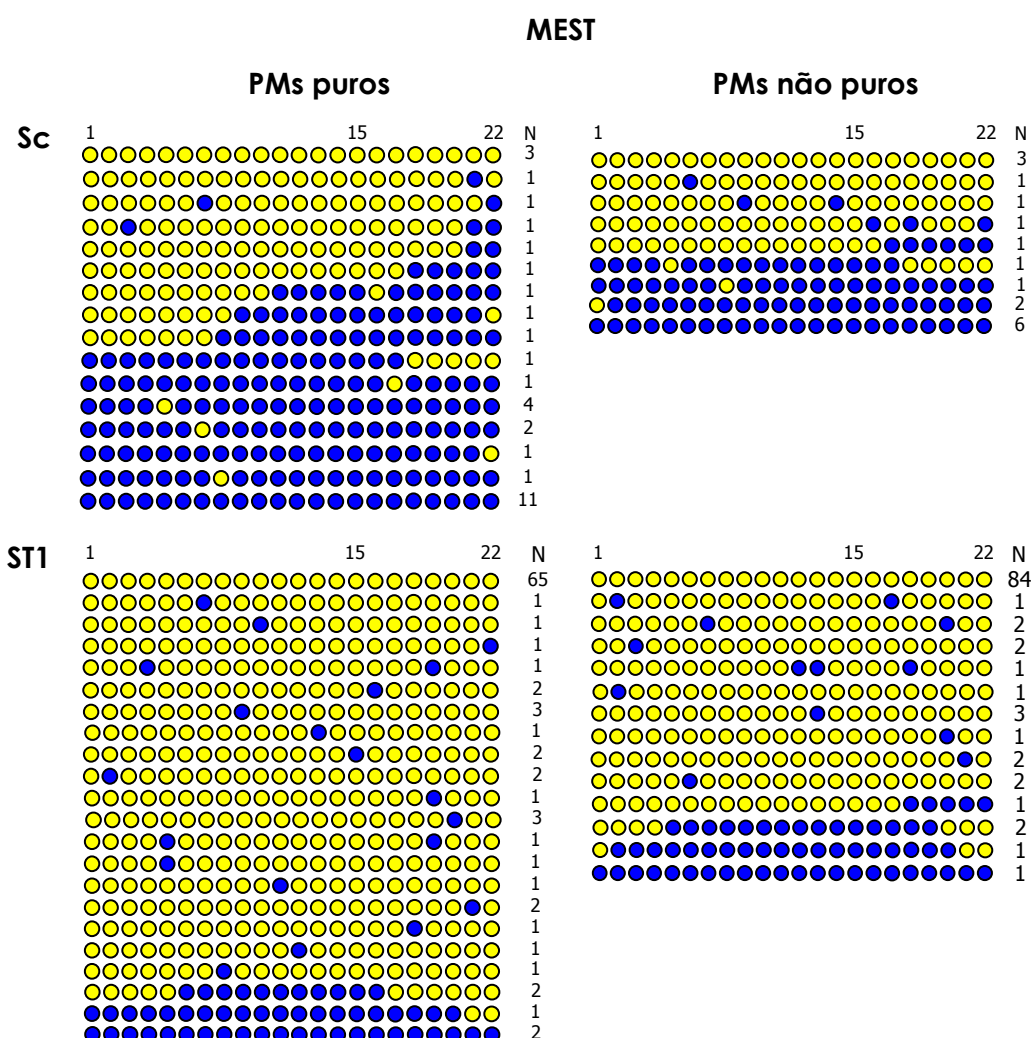


Adicionalmente, foram analisadas as RDMs de células de Sertoli de três pacientes. Os valores de desmetilação obtidos foram 30.3%, 27.3% e 40.4% para os pacientes 3, 4 e 15, respectivamente (Tabela 5).



Relativamente ao local de ligação 6 da proteína CTCF nos espermatócitos primários, a metilação observada foi 94.0% em PMs puras e 92.3% em PMs não puras ( $p=0.286$ ) (Tabela 6).

Adicionalmente, foram analisadas as RDMS de células de Sertoli. As PMs puras apresentavam 90.4% de metilação e as PMs não puras 11.8% ( $p<0.001$ ). O local de ligação 6 da proteína CTCF destas células em PMs puras apresentava 96.2% de metilação e as PMs não puras 10.0% ( $p<0,001$ ) (Tabela 6).



**Figura 17 – Perfis de metilação do gene *MEST* (22 CpGs) de PMs. CpGs: metiladas (azul), não metiladas (amarelo). Cada linha representa um perfil e o número de clones (N) por perfil.**

Na análise da desmetilação da RDM do gene *MEST* dos espermátócitos primários, as PMs puras apresentavam 94.6% de desmetilação e os PMs não puros 95.8% ( $p=0,066$ ) (Tabela 6).

Foram também analisadas as RDMs de células de Sertoli. A desmetilação nestas células é baixa tanto PMs puros como em PMs não puras, apresentando o primeiro grupo uma desmetilação de 29.0% e o segundo 40.4% ( $p<0,001$ ) (Tabela 6).

Adicionalmente, foram analisados os perfis de metilação dos genes *H19* e *MEST* em células pós-meióticas de PMs não puras (Figura 18).

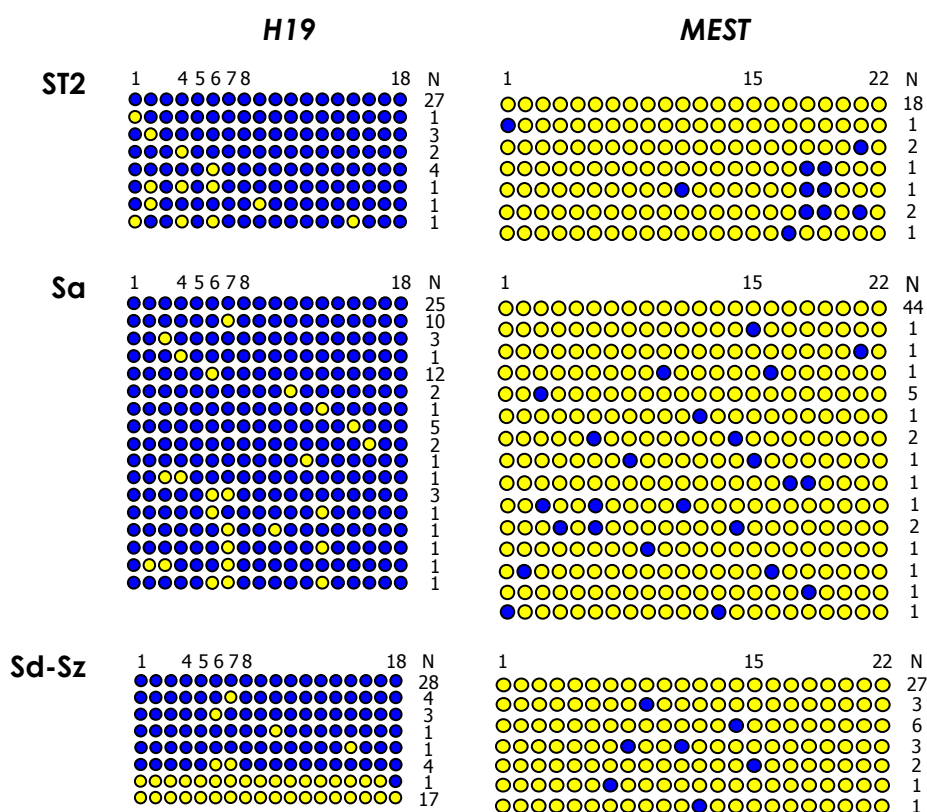


Figura 18 – Perfis de metilação dos genes *H19* (18CpGs) e *MEST* (22CpGs) de estadios adicionais de PMs não puros. Os círculos representam as CpGs: metiladas (azul), não metiladas (amarelo), polimorfismo C/T (CpG 7) do gene *H19*, local de ligação 6 da proteína CTCF (CpG 4 – 8, gene *H19*). Cada linha representa um perfil e o número de clones (N) por perfil.

Na análise da metilação da RDM do gene *H19* em células pós-meióticas de PMs não puras, é possível observar uma elevada metilação nos estádios ST2 (97.2%) e Sa (96.7%;  $p=0.584$ ), e uma metilação de 68,7% no estádio Sd-Sz ( $p<0,001$ , quando comparado com Sa) (Tabela 6). É ainda possível observar uma diferença significativa na metilação entre o estádio ST1 e ST2 ( $p=0.017$ ).

Relativamente ao local de ligação 6 da proteína CTCF em células pós-meióticas, é possível observar uma metilação semelhante nos estádios ST2 (93.8%) e Sa (93.3%;  $p=1,000$ ), e uma metilação inferior no estádio Sd-Sz (66.5%;  $p<0,001$ ; quando comparado com Sa) (Tabela 6). É também possível observar um pequeno aumento, não significativo, na metilação do local de ligação 6 da proteína CTCF entre os ST1 (92.3%) e os ST2 (93.8%;  $p=0.614$ ).

A análise da desmetilação da RDM do gene *MEST* em células pós-meióticas revelou uma desmetilação elevada em todos os estádios, sendo esta 97.4% em ST2, 97.7% em Sa ( $p=0,748$ ) e 98.0% em Sd-Sz ( $p=0,669$ , quando comparado com Sa) (Tabela 6). É ainda visível um pequeno aumento de desmetilação, não significativo, entre células pré-meióticas (95.8%) e o primeiro estádio analisado para as células pós-meióticas (ST2 – 97.4%;  $p=0,090$ ).

**Tabela 6 – Resultados globais da metilação do gene *H19* e da desmetilação do gene *MEST*.**

	Tipo de Células	Número de Células	<i>H19</i>		<i>MEST</i>
			Metilação RDM (%) (CpG metiladas/ total CpG)	Metilação CTCF (%) (CpG metiladas/ total CpG)	Desmetilação (%) (CpG não metiladas/ total CpG)
<b>PM puro</b>	Sertoli	200	<b>90.4</b> (507/561)	<b>96.2</b> (127/132)	<b>29.0</b> (204/704)
	ST1	2900	<b>95.8</b> (1955/2040)	<b>94.0</b> (451/480)	<b>94.6</b> (1998/2112)
<b>PM não puro</b>	Sertoli	300	<b>11.8</b> (40/340)	<b>10.0</b> (8/80)	<b>40.4</b> (151/374)
	ST1	2585	<b>95.1</b> (2505/2635)	<b>92.3</b> (572/620)	<b>95.8</b> (2192/2288)
	ST2	300	<b>97.2</b> (661/680)	<b>93.8</b> (150/160)	<b>97.4</b> (557/572)
	Sa	900	<b>96.7</b> (1167/1207)	<b>93.3</b> (265/284)	<b>97.7</b> (1375/1408)
	Sd-Sz	750	<b>68.7</b> (689/1003)	<b>66.5</b> (157/236)	<b>98.0</b> (927/946)

## **4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO**

---

O presente trabalho descreve pela primeira vez perfis de metilação dos genes *imprinted H19* e *MEST* em vários estadios da espermatogénese humana em pacientes com azoospermia secretora devido a paragem de maturação (PM) meiótica.

As técnicas utilizadas – tratamento do DNA com bissulfito de sódio de modo a permitir o estudo do estado de metilação das citosinas localizadas nos dinucleotídeos CpG, amplificação do DNA modificado pela técnica de *hemi-nested* PCR e clonagem molecular dos fragmentos amplificados por PCR – são extremamente sensíveis e permitiram estudar o estado de metilação de cada CpG individualmente, obtendo os perfis completos de metilação de cada fragmento presente no produto amplificado. Foi possível, assim, um estudo muito pormenorizado dos padrões de metilação presentes nas células estudadas. Adicionalmente, estas técnicas permitem obter resultados utilizando um número muito reduzido de células (100-800). Este facto, possibilita o estudo de células humanas da espermatogénese, difíceis de obter, tal como as descritas neste estudo. No entanto, o tratamento com bissulfito de sódio causa degradação do DNA, tornando a amplificação apenas por PCR *single* difícil de concretizar. Por outro lado, na amplificação por *hemi-nested* PCR e/ou na clonagem molecular pode ocorrer um enviesamento de resultados. Assim, os padrões de metilação menos representados no produto de PCR poderão não aparecer nos resultados finais. Estas desvantagens foram ultrapassadas uma vez que pela utilização de *hemi-nested* PCR foi possível obter amplificação das regiões em estudo. E ainda pelo facto de se ter efectuado a sequenciação directa dos produtos de PCR, o que permitiu excluir o enviesamento durante o processo de clonagem uma vez que os padrões de metilação globais também foram observados nos fragmentos individuais.

Os resultados obtidos para as células de Sertoli mostram alelos metilados e alelos desmetilados tanto em PMs puras como em PMs não puras, para os dois genes estudados. Estes perfis são semelhantes aos obtidos num estudo da metilação do gene *MEST* realizado com células de Sertoli fetais humanas, onde se observou a presença de alelos completamente não metilados (50%), alelos totalmente metilados (30%) e alelos com metilação intermédia (8/22 CpGs metiladas; 20%) (Kerjean *et al.*, 2000). Tais resultados podem ser explicados pelo

facto de as células de Sertoli serem células somáticas, pelo que se encontram presentes as marcas de *imprinting* maternas e paternas. Contudo, no paciente 3 todos os clones estavam metilados no gene *H19*. O método de clonagem e sequenciação permite diferenciar os dois alelos, devido à presença de polimorfismos. Neste caso particular, verificou-se que ambos os alelos materno e paterno estavam presentes, o que significa que o resultado obtido não se deve a um enviesamento na reacção de PCR. Uma possível explicação seria a linha germinal feminina apresentar incorrectamente metilação no gene *H19*, herdada pelo embrião. No entanto, neste caso, seria de esperar que todas as células do indivíduo apresentassem esta metilação incorrecta e consequente ausência de expressão do gene *H19*. Esta situação deveria resultar no impedimento do desenvolvimento do embrião, uma vez que o gene *H19* é sugerido como fundamental (Poirier *et al.*, 1991). Levaria também à expressão bialélica do gene *IGF2*, que resultaria também em anomalias no desenvolvimento. Outra explicação seria a metilação *de novo* deste alelo, nas células de Sertoli deste paciente, através da acção das enzimas metiltransferases *de novo*, embora esteja ainda por esclarecer se estas enzimas são sintetizadas e activas nestas células.

Erros de *imprinting* associados à espermatogénese anormal foram já descritos, tendo sido observado que pacientes com oligozoospermia e azoospermia secretora com hipoplasia germinativa apresentavam desmetilação da RDM do gene *H19* (Marques *et al.*, 2004, 2008, 2009; Kobayashi *et al.*, 2007) e metilação do gene *MEST* (Kobayashi *et al.*, 2007; Marques *et al.*, 2008), sendo estes erros mais acentuados com o agravamento da patologia (Marques *et al.*, 2008, 2009). Os resultados obtidos neste estudo são concordantes com os observados anteriormente, uma vez que aqui se observaram erros de *imprinting*, nomeadamente desmetilação completa do gene *H19* e/ou metilação completa do gene *MEST*, em espermátócitos primários de pacientes com paragem de maturação pura e não pura e em espermatozóides de pacientes com paragem de maturação não pura. Para o gene *H19*, os pacientes com paragem de maturação não pura parecem apresentar padrões de metilação mais afectados, o que é concordante com o observado em pacientes com oligozoospermia grave, uma vez que PMs não puras podem também apresentar

cl clinicamente oligozoospermia muito grave. Deste modo, a paragem de maturação meiótica pura parece não afectar o estabelecimento da metilação no gene *H19*, embora alguma hipometilação possa ser observada. Por outro lado, a desmetilação do gene *MEST* parece não ter sido correctamente efectuada nos estádios que precedem os espermátócitos primários, tanto em pacientes com paragem de maturação pura como em não pura. Isto pode significar que anomalias no estadio de células primordiais germinativas podem afectar a espermatogénese futura mas também o apagamento da metilação dos genes *imprinted*.

Adicionalmente, ratinhos *knockout* condicionais na linha germinativa para a enzima Dnmt3a e Dnmt3L apresentam paragem de maturação meiótica em espermátócitos primários e erros de *imprinting* do gene *H19* em mosaicismo (Kaneda *et al.*, 2004; Webster *et al.*, 2005). No entanto, um estudo realizado em pacientes com paragem de maturação em espermátócitos e em pacientes com paragem de maturação em espermatogónias não revelou anomalias na metilação do gene *H19* (Hartmann *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos no presente estudo não são concordantes com os descritos por Hartmann e colaboradores (2006), uma vez que é possível observar alguma desmetilação no gene *H19*. O estudo anteriormente referido utilizou uma abordagem com base em análise de restrição, com a enzima TaqI e *single strand conformation polymorphism* (SSCP) para analisar a metilação. Através desta abordagem, os autores apenas analisaram uma CpG da RDM do gene *H19*, que corresponde à CpG 9 do presente estudo. A discordância entre os resultados pode ser explicada pelo facto de a análise por SSCP ser menos sensível que a realizada neste trabalho. A análise da CpG 9 mostra que em 275 clones de espermátócitos primários (PMs puras e PMs não puras) apenas 12 apresentavam esta CpG desmetilada (Figura 16), o que corresponde a 4,36%. Uma percentagem tão baixa de desmetilação poderá não ser detectável por SSCP, o que explicaria o facto de naquele estudo não terem sido encontradas anomalias na metilação.

Globalmente, nas PMs puras e não puras, é visível uma metilação elevada para o *H19* e desmetilação para o *MEST*, em todos os estádios da espermatogénese, com excepção do estadio Sd-Sz (PM não puras) para o gene



*H19*, que apresenta um decréscimo na metilação. O baixo valor de metilação para este estadio, deve-se ao facto do paciente 13 apresentar apenas 10.3% de metilação. Se este paciente for retirado da análise de metilação da RDM para o estadio Sd-Sz, obtém-se uma metilação de 98.6%. Esta metilação elevada do gene *H19* e desmetilação do gene *MEST* foi também observada em todos os estádios da espermatogénese em indivíduos que apresentavam espermatogénese testicular normal, sugerindo que as marcas de *imprinting* encontravam-se já estabelecidas no estadio de espermatogónia humana adulta (Marques *et al.*, dados não publicados), tal como observado nos ratinhos (Kato *et al.*, 2007). No entanto, o facto da posição das citosinas alteradas ser diferente, no mesmo paciente, entre estadios sugere que eventos de metilação/desmetilação podem ocorrer durante a espermatogénese humana. Foi sugerido que a enzima *Dnmt1* pode ser responsável pela propagação da metilação numa região que já se encontre parcialmente metilada, agindo assim como uma metiltransferase de novo (Warnecke *et al.*, 1998; Fatemi *et al.*, 2001). Tal facto poderá explicar a re-metilação verificada ao longo da espermatogénese, uma vez que esta enzima se encontra presente em todos os estádios da espermatogénese humana (Marques *et al.*, dados não publicados).

Relativamente ao local-6 de ligação da proteína CTCF, foi também verificada a existência de clones com CpGs não metiladas. Uma vez que a proteína CTCF se liga apenas na presença de DNA não metilado, a desmetilação de CpGs do local de ligação da proteína CTCF pode conduzir à ligação desta proteína e consequente expressão anormal do *H19* e uma inactivação anormal do *IGF2*. No entanto, a análise estatística não revelou diferenças significativas na metilação/desmetilação entre os espermatócitos primários de PMs puras e PMs não puras ( $p=0,232$  para o *H19*;  $p=0,066$  para o *MEST*) sugerindo que estas duas condições não são diferentes no que respeita às marcas de *imprinting* mas que ambas, uma vez que apresentam espermatogénese anormal, podem apresentar erros de *imprinting* nas células da espermatogénese que estão presentes no testículo.

Actualmente, o uso de espermatozóides testiculares para injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI - *intracytoplasmatic sperm injection*) é o método mais utilizado no tratamento de infertilidade masculina severa. Foi

sugerido que esta técnica, por ultrapassar a selecção natural de espermatozóides aberrantes, pode causar, no embrião, divisões celulares irregulares devido à manipulação mecânica dos gâmetas (Hewitson *et al.*, 1999) e pode transmitir geneticamente infertilidade (Ma *et al.*, 2000). Adicionalmente, o uso de espermatozóides testiculares para ICSI levantou a questão se o *imprinting* genómico destes gâmetas já estaria correctamente estabelecido (Tycko *et al.*, 1997). Como referido anteriormente, já foi descrito que as marcas de *imprinting* na linha germinal masculina, já se encontram correctamente estabelecidas antes de as células entrarem em meiose (Kerjean *et al.*, 2000), mais concretamente em espermatogónias A (Marques *et al.*, dados não publicados). Também no presente estudo, a metilação do gene *H19* e desmetilação do gene *MEST* eram elevadas nos estádios estudados, sugerindo que as marcas de *imprinting* estão já estabelecidas nas células da espermatogénese humana adulta.

Estudos clínicos referiram uma elevada incidência de doenças relacionadas com *imprinting* genómico em crianças concebidas por técnicas de reprodução medicamente assistida (Hartmann *et al.*, 2006). Foi também descrito que o uso de espermatozóides testiculares de pacientes com azoospermia secretora para ICSI resulta em taxas de fertilização e gravidez baixas quando comparadas com as obtidas para pacientes com azoospermia obstrutiva (Vernaeve *et al.*, 2003). No presente estudo verificou-se que pacientes com azoospermia secretora devido a paragem de maturação podem apresentar erros de *imprinting* nos espermatozóides testiculares, o que poderá explicar as baixas taxas de fertilização e gravidez observadas no uso de espermatozóides testiculares em determinados casos de azoospermia secretora.

Uma vez que foi observado, em células de Sertoli de um paciente, a presença apenas de clones metilados e nos restantes pacientes foi visível a presença de clones com metilação intermédia, futuramente seria interessante estudar a expressão das enzimas metiltransferases do DNA em células de Sertoli para averiguar se estas são sintetizadas, estão activas e a sua localização celular neste tipo de células. Um outro estudo possível seria analisar a expressão das enzimas metiltransferases do DNA nas células da espermatogénese de pacientes com azoospermia secretora e comparar a sua expressão em relação a pacientes com espermatogénese normal (Marques *et al.*, dados não publicados).

Tal como referido, neste trabalho é descrito, pela primeira vez, os perfis de metilação de dois genes *imprinted*, *H19* e *MEST*, em pacientes com azoospermia secretora devido a paragem de maturação. Foi demonstrado que, embora a metilação das células espermatogénicas seja globalmente elevada, estas apresentam desmetilação completa ou parcial do gene *H19*, incluindo o local de ligação-6 da proteína CTCF, e hipermetilação e metilação completa do gene *MEST*. Em conclusão, verificou-se que pacientes com paragem de maturação pura e não pura apresentam também erros de *imprinting*, tal como descrito anteriormente em pacientes com oligozoospermia e azoospermia. Estes erros poderão afectar o desenvolvimento do embrião quando transmitidos à descendência. Este estudo pretende ser um contributo para a associação, recentemente observada, entre espermatogénese anormal e ocorrência de erros de *imprinting*.

## **5. BIBLIOGRAFIA**

---

Ariel I., Ayesh S., Perlman E. J., Pizov G., Tanos V., Schneider T., Erdmann V. A., Podeh D., Komitowski D., Quasem A. S., de Groot N., Hochberg A. (1997). The product of the imprinted *H19* gene is an oncofetal RNA. *Molecular Pathology* **50** (1):34-44.

Arney K. L. (2003). *H19* and *Igf2*-enhancing the confusion?. *Trends in Genetics* **19**(1):17-23.

Bartolomei M. S., Webber A. L., Brunkow M. E., Tilghman S. M. (1993). Epigenetic mechanisms underlying the imprinting of the mouse *H19* gene. *Genes & Development* **7** (9):1663-1673.

Bartolomei M. S., Zemel S., Tilghman S. M. (1991). Parental imprinting of the mouse *H19* gene. *Nature* **351** (6322):153-155.

Barton S.C., Surani M. A., Norris M. L. (1984). Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature* **311** (5984): 374-376.

Bird A.P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321** (6067): 209-213.

Bock C., Reither S., Mikeska T., Paulsen M., Walter J., Lengauer T. (2005). BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. *Bioinformatics* **21** (21): 4067-4068.

Brannan C. I., Dees E. C., Ingram R. S., Tilghman S. M. (1990). The product of the *H19* gene may function as an RNA. *Molecular and Cellular Biology* **10** (1): 28-36.

Davis T. L., Trasler J. M., Moss S. B., Yang G. J., Bartolomei M. S. (1999). Acquisition of the *H19* methylation imprint occurs differentially on the parental alleles during spermatogenesis. *Genomics* **58** (1):18-28.

Edwards C.A. and Ferguson-Smith A.C. (2007). Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. *Current Opinion in Cell Biology* **19** (3): 281-289.

Fatemi M., Hermann A., Pradhan S., Jeltsch A. (2001). The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *Journal of Molecular Biology* **309** (5):1189-1199.

Fedoriw A. M., Stein P., Svoboda P., Schultz R. M., Bartolomei M. S. (2004). Transgenic RNAi reveals essential function for CTCF in *H19* gene imprinting. *Science* **303** (5655):283-240.

Fernandes S., Huellen K., Gonçalves J., Dukal H., Zeisler J., Rajpert De Meyts E., Skakkebaek N.E., Habermann B., Krause W., Sousa M., Barros A., Vogt P.H. (2002). High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia. *Molecular Human Reproduction* **8** (3): 286-289.

Ferguson-Smith A. C., Sasaki H., Cattanach B. M., Surani M. A. (1993). Parental-origin-specific epigenetic modification of the mouse *H19* gene. *Nature* **362** (6422): 751-755.

Ferrás C., Fernandes S., Marques C.J., Carvalho F., Alves C., Silva J., Sousa M., Barros A. (2004). AZF and DAZ gene copy-specific deletion analysis in maturation arrest and Sertoli cell-only syndrome. *Molecular Human Reproduction* **10** (10): 755-761.

Futoshi Y. (2008). Continual Maintenance of the Blood-Testis Barrier During Spermatogenesis: The Intermediate Compartment Theory Revisited. *Journal of Reproduction and Development* **54** (5): 299-305.

Gabory A., Ripoche M. A., Yoshimizu T., Dandolo L. (2006). The *H19* gene: regulation and function of a non-coding RNA. *Cytogenetic Genome Research* **113** (1-4):188-193.

Goll M. G., Kirpekar F., Maggert K. A., Yoder J. A., Hsieh C. L., Zhang X., Golic K. G., Jacobsen S. E., Bestor T. H. (2006). Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* **311** (5759):395-398.

Hamatani T., Sasaki H., Ishihara K., Hida N., Maruyama T., Yoshimura Y., Hata J., Umezawa A. (2001). Epigenetic mark sequence of the *H19* gene in human sperm. *Biochimica et Biophysica Acta* **1518** (1-2):137-144.

Hao Y., Crenshaw T., Moulton T., Newcomb E., Tycko B. (1993). Tumor-suppressor activity of *H19* RNA. *Nature* **365** (6448):764-767.

Hartmann S., Bergmann M., Bohle R.M., Weidner W., Steger K. (2006). Genetic imprinting during impaired spermatogenesis. *Molecular Human Reproduction* **12** (6): 407-411.

Hewitson L., Dominko T., Takahashi D., Martinovich C., Ramalho-Santos J., Sutovsky P., Fanton J., Jacob D., Monteith D., Neuringer M., Battaglia D., Simerly C., Schatten G. (1999). Unique checkpoints during the first cell cycle of fertilization after intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkeys. *Nature Medicine* **5** (4):431-433.

Holstein A., Schulze W., Davidoff M. (2003). Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology* **1**: 107.

Houshdaran S., Cortessis V. K., Siegmund K., Yang A., Laird P. W., Sokol R. Z. (2007). Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm. *Public Library of Science ONE* **2** (12): 1289.

Hung A.J., King P., Schlegel P.N. (2007). Uniform Testicular Maturation Arrest: A Unique Subset of Man With Nonobstructive Azoospermia. *The Journal of Urology* **178**: 608-612.

Jinno Y., Ikeda Y., Yun K., Maw M., Masuzaki H., Fukuda H., Inuzuka K., Fujishita A., Ohtani Y., Okimoto T., Ishimaru T., Niikawa N. (1995). Establishment of functional imprinting of the *H19* gene in human developing placentae. *Nature Genetics*. **10**: 318-324.

Jinno Y., Sengoku K., Nakao M., Tamate K., Miyamoto T., Matsuzaka T., Sutcliffe J. S., Anan T., Takuma N., Nishiwaki K., Ikeda Y., Ishimaru T., Ishikawa M., Niikawa N. (1996). Mouse/human sequence divergence in a region with a paternal-specific methylation imprint at the human *H19* locus. *Human Molecular Genetics* **5** (8):1155-1161.

Jue K., Bestor T. H., Trasler J. M. (1995). Regulated synthesis and localization of DNA methyltransferases during spermatogenesis. *Biology of Reproduction* **53** (3):561-569.

Kaneda M., Okano M., Hata K., Sado T., Tsujimoto N., Sasaki H. (2004). Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in parental an maternal imprinting. *Nature* **429** (6994):900-903.

Kato Y., Kaneda M., Hata K., Kumaki K., Hisano M., Kohara Y., Okano M., Li E., Nozaki M., Sasaki H. (2007). Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Human Molecular Genetic* **16** (19):2272-2280.

Kerjean A., Dupont J., Vasseur C., Tessier D.L., Cuisset L., Pàldi A., Jouannet P., Jeanpierre M. (2000). Establishment of the paternal methylation imprint of the human *H19* and *MEST/PEG1* genes during spermatogenesis. *Human Molecular Genetics* **9** (14): 2183-2187.



Kobayashi H., Sato A., Otsu E., Hiura H., Tomatsu C., Utsunomiya T., Sasaki H., Yaegashi N., Arima T. (2007). Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Human Molecular Genetics* **16** (21):2542-2551.

La Salle S., Mertineit C., Taketo T., Moens P. B., Bestor T. H., Trasler J. M. (2004). Windows for sex-specific methylation marked by DNA methyltransferase expression profiles in mouse germ cells. *Developmental Biology* **268** (2): 403-415.

Lefebvre L., Viville S., Barton S. C., Ishino F., Keverne E. B., Surani M. A. (1998). Abnormal maternal behaviour and growth retardation associated with loss of the imprinted gene *Mest*. *Nature Genetics* **20** (2):163-169.

Lefebvre L., Viville S., Barton S. C., Ishino F., Surani M. A. (1997). Genomic structure and parent-of-origin-specific methylation of *Peg1*. *Human Molecular Genetics* **6** (11):1907-1915.

Li J.Y., Lees-Murdock D. J., Xu G. L., Walsh C. P. (2004). Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. *Genomics* **84** (6):952-960.

Li T., Vu T. H., Lee K. O., Yang Y., Nguyen C. V., Bui H. Q., Zeng Z. L., Nguyen B. T., Hu J. F., Murphy S. K., Jirtle R. L., Hoffman A. R. (2002). An imprinted *PEG1/MEST* antisense expressed predominantly in human testis and in mature spermatozoa. *The Journal of Biological Chemistry* **277** (16):13518-13527.

Lorincz M. C., Schübeler D., Hutchinson S. R., Dickerson D. R., Groudine M. (2002). DNA methylation density influences the stability of an epigenetic imprint and *Dnmt3a/b*-independent de novo methylation. *Molecular Cell Biology* **22** (21):7572-7580.

Loukinov D. I., Pugacheva E., Vatolin S., Pack S. D., Moon H., Chernukhin I., Mannan P., Larsson E., Kanduri C., Vostrov A. A., Cui H., Niemitz E. L., Rasko J. E.,

Docquier F. M., Kistler M., Breen J. J., Zhuang Z., Quitschke W. W., Renkawitz R., Klenova E. M., Feinberg A. P., Ohlsson R., Morse H. C. 3rd, Lobanenkov V. V. (2002). BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99** (10):6806-6811.

Lucifero D., Chaillet J.R., Trasler J.M. (2004). Potencial significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. *Human Reproduction Update* **10** (1): 3-18.

Ma K., Mallidis C., Bhasin S. (2000). The role of Y chromosome microdeletions in male infertility. *European Journal of Endocrinology* **142**:418-430.

Marques C.J., Carvalho F., Sousa M., Barros A. (2004). Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet* **363** (9422): 1700-1702.

Marques C.J., Costa P., Vaz B., Carvalho F., Fernandes S., Barros A., Sousa M. (2008). Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Molecular Human Reproduction* **14**(2): 67-74.

Marques C.J., Francisco T., Sousa S., Carvalho F., Barros A., Sousa M. (2009). Methylation defects of imprinted genes in human testicular spermatozoa. *Fertility and Sterility* doi:10.1016/j.fertnstert.2009.02.051.

Mertineit C., Yoder J.A., Taketo T., Laird D. W., Trasler J. M., Bestor T. H. (1998). Sex-specific exons control DNA methyltransferases in mammalian germ cells. *Development* **125** (5):889-897.

Munshi A., Duvvuri, S. (2007). Genomic imprinting - the story of the other half and the conflicts of silencing. *Journal of Genetics and Genomics* **34**(2):93-103.

Nakabayashi K., Bentley L., Hitchins M. P., Mitsuya K., Meguro M., Minagawa S., Bamforth J. S., Stanier P., Preece M., Weksberg R., Oshimura M., Moore G. E., Scherer S. W. (2002). Identification and characterization of an imprinted antisense RNA (*MESTIT1*) in the human *MEST* locus chromosome 7q32. *Human Molecular Genetics* **11** (15):1743-1756.

Nishita Y., Yoshida I., Sado T., Takagi N. (1996). Genomic imprinting and chromosomal localization of the human *MEST* gene. *Genomics* **36** (3):539-542.

Oakes C. C., La Salle S., Smiraglia D. J., Robaire B., Trasler J. M. (2007). Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Developmental Biology* **307** (2):368-379.

Olek A., Walter J. (1997). The pre-implantation ontogeny of the *H19* methylation imprint. *Nature Genetics* **17** (3):275-276.

Omisanjo O. A., Biermann K., Hartmann S., Heukamp L. C., Sonnack V., Hild A., Brehm R., Bergmann M., Weidner W., Steger K. (2007). DNMT1 and HDAC1 gene expression in impaired spermatogenesis and testicular cancer. *Histochemistry and Cell Biology* **127**(2):175-181.

Pedersen I. S., Dervan P., McGoldrick A., Harrison M., Ponchel F., Speirs V., Isaacs J. D., Gorey T., McCann A. (2002). Promoter switch: a novel mechanism causing biallelic *PEG1/MEST* expression in invasive breast cancer. *Human Molecular Genetics* **11** (12):1449-1453.

Poirier F., Chan C.-T. J., Timmons P. M., Robertson E. J., Evans M. J., Rigby P. W. J. (1991). The murine *H19* gene is activated during embryonic stem cell differentiation *in vitro* and at the time of implantation in the developing embryo. *Development* **113**: 1105-1114.

Reik W., Walter J. (2001). Genomic Imprinting: Parental Influence on the Genome. *Nature Reviews Genetics* **2**: 21-32.

Riesewijk A. M., Hu L., Schulz U., Tariverdian G., Hoglund P., Kere J., Ropers H.-H., Kalscheuer V. M. (1997). Monoallelic expression of human PEG1/MEST is paralleled by parent-specific methylation in fetuses. *Genomics* **42** (2): 236-244.

Schoenherr C. J., Levorse J. M., Tilghman S. M. (2003). CTCF maintains differential methylation at the *Igf2/H19* locus. *Nature Genetics* **33** (1):66-69.

Sousa M., Barros A. (2000). Aspectos Biológicos da Fecundação Humana. *Revista de Ginecologia e Medicina da Reprodução* **25** (2 e 3): 7-22.

Sousa M., Cremades C., Alves C., Silva J., Barros A. (2002). Developmental potential of human spermatogenic cells cocultured with Sertoli cells. *Human Reproduction* **17**:161-72.

Swales A.K.E., Spears N. (2005). Genomic imprinting and reproduction. *Reproduction* **130**: 389-399.

Takai D., Gonzales F.A., Tsai Y.C., Thayer M.J., Jones P.A. (2001). Large scale mapping of methylcytosines in CTCF-binding sites in the human *H19* promoter and aberrant hypomethylation in human bladder cancer. *Human Molecular Genetics* **10**: 2619-2626.

Tremblay K. D., Saam J. R., Ingram R. S., Tilghman S. M., Bartolomei M. S. (1995). A paternal-specific methylation imprint marks the alleles of the mouse *H19* gene. *Nature Genetics* **9** (4):407-413.

Tycko B., Trasler J., Bestor T. (1997). Genomic imprinting: gametic mechanisms and somatic consequences. *Journal of Andrology* **18** (5):480-486.

Vernaeve V., Tournaye H., Osmanagaoglu K., Verheyen G., Van Steirteghem A., Devroey P. (2003). Intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa is less successful in men with nonobstructive azoospermia than in men with obstructive azoospermia. *Fertility and Sterility* **79**:529-533.

Webster K.E., O'Bryan M.K., Fletcher S., Crewther P.E., Aapola U., Craig J., Harrison D.K., Aung H., Phutikanit N., Lyle R., Meachem S.J., Antonarakis S.E., Kretser D.M., Hedger M.P., Peterson P., Carroll B.J., Scott H.S. (2005). Meiotic and epigenetic defects in Dnmt3L-knockout mouse spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102** (11): 4068-4073.

Warnecke P. M., Binizskiewicz D, Jaenisch R., Frommer M., Clark S. J. (1998). Sequence-specific methylation of the mouse *H19* gene in embryonic cells deficient in the Dnmt-1 gene. *Developmental Genetics* **22** (2):111-121.

World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction 4ª edição. Cambridge University Press 1999.

Wigler M., Levy D., Perucho M. (1981). The somatic replication of DNA methylation. *Cell* **24** (1): 33-40.

Yang Y., Ma M. Y., Xiao C.Y., Li L., Li S.W., Zhang S. Z. (2007). Massive deletion in AZFb/AZFb+c and azoospermia with Sertoli cell and/or maturation arrest. *International Journal of Andrology* **31**: 573-578.

Zhang Y., Tycko B. (1992). Monoallelic expression of the human *H19* gene. *Nature Genetics* **1** (1):40-44.

### Webgrafia

Embryology.ch. Universidade de Fribourg. 03 Abr 2009. <<http://www.embryology.ch/anglais/cgametogen/spermato03.html>>.

Geneimprint.com. Universidade de Duke. 27 Mar 2009. <<http://www.geneimprint.com/site/genes-by-species.Homo+sapiens.imprinted-All>>.

Invitrogen.com.            Invitrogen.            15            Abr            2009.  
<[http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcritopo\\_map.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcritopo_map.pdf)>.

Medical-Look.com.    Medical-Look.com.    03    Abr    2009.    <[http://www.medical-look.com/human\\_anatomy/organs/Spermatozoa.html](http://www.medical-look.com/human_anatomy/organs/Spermatozoa.html)>.

MRCHarwell.        Medical        Research        Council.        27        Mar        2009.  
<<http://www.har.mrc.ac.uk>>.

NCBI.gov.        US        National        Library        of        Medicine.        06        Set        2008.  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>.

Qiagen.com.            Qiagen.            15            Abr            2009.            <<http://www1.qiagen.com/Products/QIAxcelDNAkits.asp>>.

## **6. ANEXOS**

---

## ANEXO I

**Tratamento com bissulfito de sódio utilizando o EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen)**

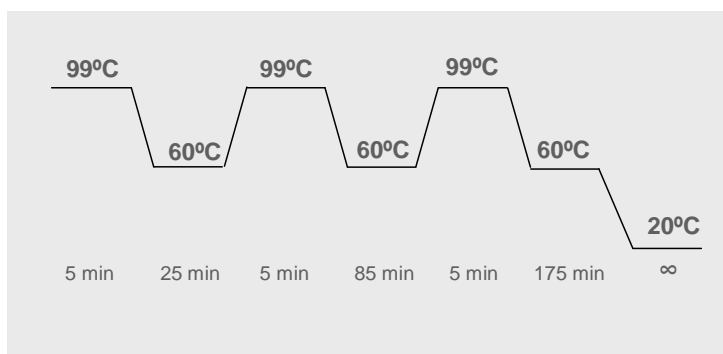
- 1) Adicionar à amostra os reagentes de acordo com a Tabela 7 e pela ordem indicada.

**Tabela 7 – Componentes da Reacção de Bissulfito de Sódio.**

Reagentes	Volume por amostra (µL)
Amostra	Variável* (até 40µL)
H <sub>2</sub> O	Variável*
Mix de Bissulfito	85
<i>DNA Protect Buffer</i>	15

\*O volume da amostra em conjunto com o da água não deve ultrapassar os 40µL.

- 2) Realizar a conversão do DNA utilizando um termociclador e o seguinte programa:

**Figura 19 – Condições para a reacção de conversão.**

- 3) Centrifugar brevemente os tubos de PCR que contêm a reacção de bissulfito.
- 4) Transferir as reacções de bissulfito para tubos de 1,5mL e proceder à purificação.
- 5) Adicionar 560µL de tampão BL. Vortexar e centrifugar brevemente.



- 6) Transferir a mistura para uma coluna EpiTect (fornecida com o kit).
- 7) Centrifugar durante 1min à velocidade máxima. Descartar o *flow-through* e colocar a coluna novamente no tubo colector.
- 8) Adicionar 500µL de tampão BW à coluna e centrifugar durante 1min à velocidade máxima. Descartar o *flow-through* e colocar a coluna novamente no tubo colector.
- 9) Adicionar 500µL de tampão BD e incubar durante 15min à temperatura ambiente.
- 10) Centrifugar durante 1min à velocidade máxima. Descartar o *flow-through* e colocar a coluna novamente no tubo colector.
- 11) Adicionar 500µL de tampão BW à coluna e centrifugar durante 1min à velocidade máxima. Descartar o *flow-through* e colocar a coluna novamente no tubo colector.
- 12) Repetir o passo anterior.
- 13) Colocar a coluna num novo tubo colector de 2mL. Centrifugar durante 1min à velocidade máxima para remover possíveis resíduos de etanol.
- 14) Colocar a coluna num novo tubo de 1,5mL. Adicionar 20µL de tampão EB no centro da membrana.
- 15) Centrifugar durante 1min a aproximadamente 12,000 rpm.
- 16) Colocar a coluna num novo tubo de 1,5mL e adicionar 20µL de tampão EB no centro da membrana, para se obter 2 eluições.
- 17) Centrifugar durante 1min a aproximadamente 12,000 rpm.
- 18) Armazenar o DNA a -20°C até ser utilizado.

## ANEXO II

### **Purificação dos produtos de PCR utilizando o GFX PCR-DNA Purification Kit (Amersham Biosciences)**

- 1) Adicionar 500µL de tampão de captura tipo 2 à amostra e carregar esta mistura na coluna de purificação (com o tubo colector).
- 2) Centrifugar durante 30seg a 14000 rpm.
- 3) Descartar o *flow-through* e colocar novamente a coluna no tubo colector.
- 4) Adicionar 500µL de tampão de lavagem tipo 1 à coluna.
- 5) Centrifugar durante 30seg a 14000 rpm.
- 6) Descartar o tubo colector e colocar a coluna de purificação num novo tubo de 1,5mL.
- 7) Adicionar 20µL de tampão de eluição tipo 4 no centro da membrana da coluna quando se tratar de amostras do gene *H19* e 30µL quando forem amostras do gene *MEST*.
- 8) Incubar durante 1min à temperatura ambiente.
- 9) Centrifugar durante 1min a 14000 rpm para recuperar o DNA purificado no fundo do tubo.
- 10) Armazenar a -20°C até a utilização.

**ANEXO III****Clonagem molecular utilizando o kit TOPO TA Cloning (Invitrogen)**

- 1) Preparar a reacção de clonagem de acordo com a Tabela 8.

**Tabela 8 – Componentes da reacção de clonagem.**

<b>Reagente</b>	<b>Volume (µL)</b>
Produto de PCR	0,5 – 4
Solução Salina	1
Água	Até perfazer 5µL
Vector TOPO	1
Volume Final	6

- 2) Vortexar a mistura e incubar durante 15min à temperatura ambiente.
- 3) Adicionar 2µL da reacção de clonagem a uma alíquota de bactérias, e agitar suavemente.
- 4) Incubar em gelo durante 30min.
- 5) Colocar a alíquota de bactérias durante 30seg a 42°C, para provocar choque térmico.
- 6) Transferir imediatamente para gelo e deixar durante 2min.
- 7) Adicionar 250µL de meio S.O.C.
- 8) Colocar o tubo num agitador orbital durante 1h a 37°C e agitação a 225rpm.
- 9) Espalhar 40µL de IPTG e X-Gal nas placas de cultura.
- 10) Espalhar 50µL das bactérias transformadas numa placa e 100µL noutra, de modo a se obter duas concentrações.
- 11) Incubar as placas a 37°C durante a noite numa estufa térmica.
- 12) Picar 29 colónias brancas para nova placa utilizando um palito estéril.
- 13) Das primeiras 20 colónias colocar o palito usado em tubos com TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, Sigma) 10<sup>-1</sup>. Usar o conteúdo do tubo (suspensão de bactérias) para a amplificação do plasmídeo.

- 14) Colocar a nova placa na estufa e deixar a crescer durante a noite.
- 15) As restantes placas selar com parafilme e guardar a 4°C.
- 16) No dia seguinte, retirar as placas da estufa e guardar a 4°C para possível nova utilização.